

Diagnose von Viruskrankheiten im Rahmen der Anerkennung von Anbaumaterial von Kernobst und Entwicklung von Verfahren zur Gesunderhaltung von zertifiziertem Material in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen

Diagnosis of virus diseases for the certification of pome and fruit plant material and development of procedures for health management of certified material within scion mothergardens and rootstock nurseries

FKZ: 12NA049

Projektnehmer:

Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg
Neßlerstraße 25, 76227 Karlsruhe
Tel.: +49 721 9468-0
E-Mail: poststelle@ltz.bwl.de
Internet: www.ltz-bw.de

Autoren:

Schröder, Manfred

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg
Neßlerstr. 25
76227 Karlsruhe

Schlussbericht Projekt

Diagnose von Viruskrankheiten im Rahmen der Anerkennung von Anbaumaterial von Kernobst und Entwicklung von Verfahren zur Gesunderhaltung von zertifiziertem Material in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen

Förderkennzeichen: 2812NA049

Laufzeit und Berichtszeitraum: 15.10.2012 bis 31.10.2016

Am Projekt beteiligte Kooperationspartner:

Julius-Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau,
Schwabenheimer Straße 101, 69221 Dossenheim (Prof. Dr. Jelkmann, Dr. Schneider)

Förderkennzeichen: 2812NA019

Kurzfassung

Dr. Manfred Schröder, Neßlerstr. 25, 76227 Karlsruhe; poststelle@ltz.bwl.de

Diagnose von Viruskrankheiten im Rahmen der Anerkennung von Anbaumaterial von Kernobst und Entwicklung von Verfahren zur Gesunderhaltung von zertifiziertem Material in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen

Zurückliegende Befallssituationen in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen haben gezeigt, dass noch Untersuchungsbedarf hinsichtlich eines verbesserten Testmanagements und der Abschätzung des Übertragungspotenzials bei einigen Apfelviren über den Boden für eine Risikominimierung besteht. Bei den Phytoplasmen bestand insbesondere für den Birnenverfall die Notwendigkeit einer Verbesserung der Detektionsrate. Deshalb wurden in Topf- und Freilanduntersuchungen schwerpunktmäßig folgende Themen bearbeitet:

- Ermittlung der Bedeutung einer abiotischen Bodenübertragung von *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple stem grooving virus* und *Apple stem pitting virus* an einer Apfel-Standardunterlage
- Ermittlung von Nachweisgrenzen latenter Apfelviren im jahreszeitlichen Verlauf und bestmöglicher Probenahmezeiträume bei Reiserschnittbäumen
- Abschätzung des Risikos für die Einschleppung latenter Apfelviren und Phytoplasmen mit Kernobst-Pflanzmaterial für Reiserschnittgärten und ggf. die Identifizierung der Kontaminationsquellen
- Ermittlung verbesserter Detektionsmöglichkeiten beim Birnenverfall durch optimale Kombination vorhandener Extraktions- und Nachweisverfahren sowie Probenahmengen.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden: Mehrjährige Untersuchungen bei den Apfelviren ergaben keine Hinweise auf eine größere Bedeutung einer Bodenübertragung bei der Standard-Unterlage ‚Bittenfelder Sämling‘. Die Viren sind mit der PCR ganzjährig nachweisbar, die höchsten Verdünnungsgrenzen und damit als optimaler Probenahmezeitraum konnten aber insgesamt die Monate Januar bis April ermittelt werden. Stichprobenartige Testungen an Pflanzmaterial (Apfel, Birne, Quitte) für einen Reiserschnittgarten ergaben keinen Befall mit Phytoplasmen oder Viren. Von den untersuchten Verfahren zum Nachweis des Birnenverfalls erzielte die Silicagel-Extraktion in Kombination mit der realtime PCR und einer Verwendung von fünf Triebstücken je Baum die höchste Detektionsrate.

Diagnosis of virus diseases for the certification of pome and fruit plant material and development of procedures for health management of certified material within scion mothergardens and rootstock nurseries

Past infestation events in scion mothergardens and rootstock nurseries have shown that investigations are still needed for an improved test management and estimation of potential soil transmission for some apple viruses in order to minimize the risk of infections. With respect to the phytoplasmas, in particular for pear decline the need to

improve the detection rate was evident. Therefore, pot and field experiments were focused on following topics:

- Determining the importance of abiotic soil transmission of *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple stem grooving virus* and *Apple stem pitting virus* for an apple rootstock standard variety
- Determination of detection limits of latent apple viruses at scion mother trees in seasonal cycle and optimal sampling times
- Risk analysis of introducing latent apple viruses and phytoplasmas with pome fruit planting material in scion mother gardens and possibly identifying the sources of contamination
- Investigation of optimal use of existing extraction and detection methods and sampling quantities in order to improve detection routine for pear decline.

The following results were obtained: Multi-year studies with the standard rootstock ‚Bittenfelder Sämling‘ did not indicate a greater importance for soil transmission of the apple viruses. The viruses are detectable all year round with the PCR, however highest dilution limits were found from January to April, therefore representing the optimal sampling period. Random testing of viruses and phytoplasmas at apple, pear, quince, intended for planting in a scion mother garden, didn't reveal any infections. Among the used methods for the detection of pear decline best results were observed by silica extraction combined with real-time PCR and a total of five scion piece samples per tree.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einführung	5
1.1 Gegenstand des Vorhabens	5
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Teilprojekts	6
1.3 Planung und Ablauf des Teilprojekts	7
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	8
2.1 Bodenübertragbarkeit von Apfelvirose	8
2.2 Nachweismöglichkeiten von Apfelviren im Jahresverlauf	9
2.3 Eintragsquellen von Apfelviren und Phytoplasmen in Reisermuttergärten mit Pflanzmaterial	9
2.4 Nachweismöglichkeit von Birnenverfall im Jahresverlauf	10
3 Material und Methoden	10
3.1 Untersuchungen zur Bodenübertragbarkeit von Apfelviren	10
3.1.1 Topfversuche	10
3.1.1.1 Pflanzen ohne Wurzelsperre	11
3.1.1.2. Pflanzen mit Wurzelsperre	11
3.1.1.3. Infektionsversuch über zugesetztes Bodeneluat	12
3.1.2 Freilanduntersuchungen	14
3.1.2.1 Aufpflanzversuch	14
3.1.2.2 Nachpflanzversuch	15

3.1.2.3 Untersuchungen zur Virusverteilung in einem Unterlagenquartier ...	16
3.2 Nachweismöglichkeit im Jahresverlauf	16
3.3 Optimierung des Nachweises von Birnenverfall im jahreszeitlichen Verlauf	17
3.4 Überprüfung möglicher Phytoplasmen-Eintragungen durch Pflanzmaterial in einen Reiserschnittgarten	17
3.5 Molekularbiologische Nachweisverfahren	17
3.5.1 Nukleinsäureextraktion	17
3.5.2 Viren	18
3.5.3 Phytoplasmen	18
3.5.4 Sequenzierung	19
3.5.5 Nematoden	19
4 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	20
4.1 Topf- und Freilanduntersuchungen zur Bodenübertragung	20
4.1.1 Topfversuche mit/ohne Wurzelsperre	20
4.1.2 Infektionsversuch über zugesetztes Bodeneluat	24
4.1.3 Aufpflanzversuch	24
4.1.4 Nachpflanzversuch	27
4.1.5 Untersuchungen zur Virusverteilung in einem Apfelunterlagenquartier	27
4.2 Nachweismöglichkeit von Apfelviren im Jahresverlauf	28
4.3 Optimierung des Nachweises von Birnenverfall im jahreszeitlichen Verlauf	31
4.3.1 Vergleich zwischen Silicagel-Extraktionsmethode und Fertigkeit	35
4.3.2 Vergleich der Nachweismethoden	35
4.3.3 Vergleich der Anzahl untersuchter Triebstückproben je Baum.....	36
4.4 Überprüfung von Pflanzmaterial hinsichtlich möglicher Viren- und Phytoplasmen-Eintragungen in einen Reiserschnittgarten	37
5 Diskussion der Ergebnisse	37
6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	44
7 Ursprünglich geplante und erreichte Ziele, weiterführende Fragestellungen .	45
8 Zusammenfassung	47
9 Literaturverzeichnis	49
10 Realisierte und geplante Veröffentlichungen	53

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACLSV	Apple chlorotic leafspot virus (Chlorotisches Blattfleckenvirus des Apfels)
ApMV	Apple mosaic virus (Apfelmosaikvirus)
AP	Apple proliferation (Apfeltriebsucht)

ASGV	Apple stem grooving virus (Stammfurchungsvirus des Apfels)
ASPV	Apple stem pitting virus (Stammnarbungsvirus des Apfels)
ca.	cirka
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii
i.d.R.	in der Regel
Fa.	Firma
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
JKI	Julius-Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
l	Liter
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LTZ	Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg Karlsruhe
max.	maximal
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Pear decline (Birnenverfall)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Rt-LAMP	Real-time Loop-mediated isothermal amplification
Rt-PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
V	Volt
v.a.	vor allem
vf	„virusfrei“ nach Anbaumaterialverordnung (AGOZV)
vgl.	vergleiche
vt	„virusgetestet“ nach Anbaumaterialverordnung (AGOZV)
z.B.	zum Beispiel

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

In einer Studie zur „Entwicklung eines Konzeptes zur Versorgungssicherheit der deutschen Obstgehölzproduzenten mit gesundem und qualitativ hochwertigem Vermehrungsmaterial“, welche auf Initiative vom BMELV seitens des JKI in Auftrag gegeben und 2010 abgeschlossen wurde, wurden verschiedene Maßnahmen zur

Erreichung der dort genannten Ziele vorgeschlagen. Eine besondere Dringlichkeit zeigte sich bald darauf im Bereich der Pflanzenkrankheiten, da große Probleme durch Befall mit Apfeltriebsucht und Birnenverfall in zwei deutschen Reiserschnittgärten bei Basis- bzw. zertifiziertem Material auftraten und Virusbefall in einigen zertifizierten Unterlagenbeständen nachgewiesen wurde, die bislang als virusfrei eingestuft waren. Hinzu kamen beabsichtigte Standortverlagerungen bei zwei Reiserschnittgärten, die für den notwendigen Neuaufbau Konzepte zur Risikominimierung des Befalls mit Viren und Phytoplasmen dringend erforderlich machten. Dazu wurde u.a. ein besonderer Bedarf für verbesserte Diagnosemöglichkeiten bei verschiedenen dieser Krankheiten gesehen, um diese möglichst frühzeitig und sicher, auch im Hinblick auf Massentestungen, erkennen und entsprechende Maßnahmen einleiten zu können. Mit einem gemeinschaftlichen Projekt des Julius-Kühn-Instituts für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau (Dossenheim) und dem Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (Karlsruhe) sollte deshalb ein entsprechender Beitrag geleistet werden, damit die noch verbliebenen Reiser Muttergärten sowie Obstunterlagen produzierenden Baumschulen in Deutschland auf einer phytosanitär verbesserten Grundlage viren- und phytoplasmenfreies Vermehrungsmaterial erzeugen können. Dies trägt in nicht unerheblichem Maße zur Produktionssicherheit und Erhaltung der Konkurrenzfähigkeit der Betriebe bei.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Teilprojekts

Die Ziele des Projekts sollten insgesamt zu einer Risikominimierung für bestimmte wichtige Virus- und Phytoplasmaerkrankungen bei der Produktion in allen in Deutschland existierenden Reiserschnittgärten und zertifizieren Unterlagenbeständen in spezialisierten Baumschulen beitragen, indem

- Ausgangsmaterial auf bestimmte Viruskrankheiten umfassender und sicherer untersucht werden kann,
- das Risikopotential der Ausbreitung vorhandener bzw. eingeschleppter latenter Infektionsherde von Apfelviren über den Boden im Mutterpflanzenbestand zuverlässiger als bisher einzuschätzen ist,
- Vermehrungsbestände durch ein verbessertes Testmanagement effizienter und sicherer auf Virusfreiheit und Birnenverfall überwacht und zuverlässiger gesund erhalten werden können,
- Stichprobenartige Untersuchungen an kommerziell vertriebenem Pflanzmaterial auf Viren- und Phytoplasmenfreiheit eine Risikoabschätzung zur unerkannten Einschleppung dieser Krankheiten in Reiser Muttergärten ermöglichen.

Die Verwendung gesunden und hochwertigen Ausgangsmaterials ist eine unverzichtbare Ausgangsbasis für eine nachhaltige Erzeugung, die Produktionssicherheit und damit die Sicherstellung der Versorgung mit einem breiten Obstsortenspektrum. Die Zertifizierung der Obstgehölze und des Vermehrungsmaterials stellt dabei eine besondere Form der Qualitätssicherung dar, welche wiederum als wesentlichen Bestandteil die Freiheit von Viren, virusähnlichen Schaderregern und Phytoplasmen voraussetzt, damit kein infiziertes Material in die Vermehrung und

dadurch später an den Verbraucher (Erwerbs- und Kleingärtner) gelangt. Reisermuttergärten und Unterlagenbaumschulen leisten durch die Bereitstellung gesunden Ausgangsmaterials für die Pflanzguterzeugung dazu im Obstbereich einen wichtigen Beitrag.

1.3 Planung und Ablauf des Teilprojekts

Der im Antrag für dieses Teilprojekt enthaltene Arbeitsplan gliederte sich thematisch in vier Bereiche:

1. Ermittlung der Bedeutung einer abiotischen Bodenübertragung latenter Apfelviren bei Unterlagen bzw. Reiserschnittbäumen
Dieser Projektteil umfasste sowohl Gefäß- und Freilandversuche, in denen die Häufigkeit und Zeitdauer einer Virusübertragung von künstlich virusinfizierten Apfelbäumen auf virusfrei gepflanzte Nachbarbäume untersucht werden sollten. Im Gefäßversuch wird durch das begrenzte Bodenvolumen ein intensives Ineinanderwachsen der Wurzelwerke von virusinfizierten und virusfreien Bäumen erreicht und damit ein Höchstmaß an Wurzelkontakten ermöglicht. Dadurch lassen sich maximale Virusübertragungsraten induzieren. In einer zusätzlichen Variante wurde eine Wurzelsperre eingeplant, um mögliche Virusübertragungen auf den Feinstwurzelbereich oder die Bodenlösung zurückführen zu können. In einem weiteren Versuchsteil wurde der Frage nachgegangen, ob eine Virusübertragung über ein Bodeneluat erreichen werden kann, welches aus einem Boden mit viruskranken Bäumen stammt und damit Hinweise auf frei verfügbare Viruspartikel in der Bodenlösung liefern könnte. Ergänzt wurde dieser Versuchsteil um einen Nachpflanzversuch, mit dem welchem geklärt werden sollte, ob sich Virusinfektionen in Unterlagen ergeben, die in einem Boden nachgepflanzt werden, in welchem unmittelbar zuvor viruskranke Bäume gewachsen waren. Für alle Teilversuche war ein maximal möglicher Zeitrahmen innerhalb der Projektlaufzeit vorgesehen. Als Versuchsbäume wurden unveredelte „Bittenfelder Sämling“ ausgewählt, da diese bislang die Standardunterlage bei Apfel in den Reiserschnittgärten darstellen. Andere mögliche Unterlagen (z.B. ‚Grahams‘) spielen in der Praxis keine Rolle. Weiterhin sollte ein kommerzieller Bestand mit vegetativ vermehrten Unterlagen im Hinblick auf eine natürlich vorhandene Virusverteilung untersucht werden, um ggf. Rückschlüsse auf eine erfolgte Ausbreitung über den Boden ziehen zu können.
2. Bestimmung bestmöglicher Probenahmezeiträume für ein Kontrollscreening durch Ermittlung von Nachweisgrenzen bei latenten Apfelviren.
In etwa monatlichem Abstand sollten die Nachweisgrenzen für die zu untersuchenden Viren an Reiserschnittbäumen für mindestens einen Jahreszyklus untersucht werden, um daraus Rückschlüsse auf die Testsicherheit im Jahresverlauf als auch auf die Möglichkeit von Mischproben ziehen zu können.
3. Die Identifizierung der Eintragungsquellen latenter Apfelviren und Phytoplasmen in Reisermuttergärten.

Stichprobenuntersuchungen an neu aufgepflanzten oder für eine Aufpflanzung vorgesehenen Reiserschnittbäumen oder Unterlagen in zwei Privatbetrieben sollten mögliche Herkunftswege virus- oder phytoplasmenbefallenen Baummaterials aufzeigen. Gleichzeitig sollte das Risiko der Einschleppung solchermaßen befallenen Materials in Mutterpflanzenbestände von außerhalb eingeschätzt werden. Im Falle positiver Befunde könnte dann eine Rückverfolgung zum Vermehrungsbetrieb stattfinden und dort eine phytosanitäre Bereinigung der Bestände erfolgen.

4. Untersuchungen zur Optimierung der Nachweismöglichkeit des Birnenverfalls im jahreszeitlichen Verlauf.

Für den Nachweis des Erregers des Birnenverfalls stehen unterschiedliche Extraktions- und Nachweisverfahren mit diversen Modifikationen zur Verfügung. Für DNA-Extraktionen werden v.a. Methoden verwendet, die auf der CTAB- Methode nach Doyle und Doyle (1987) oder auf dem Einsatz von Silica-Partikeln nach Boom et al. (1990) basieren, auch in Form von kommerziell verfügbaren Fertigkits. Bei den Nachweismethoden kommen hauptsächlich Verfahren wie die nested PCR, realtime PCR oder neuerdings auch das LAMP-Verfahren zur Anwendung. Johnston et al. (2014) weisen auch auf die Bedeutung einer richtigen Probenahme hin. Versuchsbäume auf der Unterlage ‚Kirchensaller Mostbirne‘, die in Reiserschnittgärten bislang als Standardunterlage verwendet wird, standen leider nicht zur Verfügung. Deshalb wurden mehrere andere Unterlagen-/Sortenkombinationen verwendet, an denen die jahreszeitliche Nachweismöglichkeit des Erregers im Vergleich häufig verwendeter Extraktionsmethoden und Nachweisverfahren sowie Probenahmemengen untersucht wurden. Im direkten Vergleich sollte damit diejenige Kombination ermittelt werden, welche die bestmögliche Detektion des Birnenverfalls ermöglicht. Obwohl der Nachweis in den Wurzeln i.d.R. ganzjährig möglich ist und aus Gründen der Testsicherheit soweit möglich bevorzugt wird, kam dies vor dem Hintergrund von Massentestungen in einem Reiserschnittgarten nicht in Betracht, da Wurzelgrabungen aus arbeitswirtschaftlichen Gründen schnell an ihre Grenzen stoßen.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

2.1 Bodenübertragbarkeit von Apfelvirose

Für die hier untersuchten Apfelviren ACLSV, ApMV, ASGV und ASPV liegen außer der hauptsächlichlichen Verbreitung durch vegetative Vermehrung kaum Erkenntnisse über weitere Übertragungswege vor. Die Viren gelten als nicht samen-, pollen- oder vektorübertragbar sowie nur auf bestimmte krautige Pflanzen teilweise schwierig mechanisch übertragbar (Jelkmann und Paunovic 2011, Massart et al. 2011, Petzlik und Lenz, 2011, Yaegashi et al. 2011). Lediglich über Wurzelverwachsungen und deren möglicher Bedeutung für die Übertragung bzw. Ausbreitung latenter Apfelviren liegen wenige Berichte vor (Hunter et al. 1958, Dhingra 1972, Guengerich und Millikan 1965, Henkel 2012), wobei hierbei überwiegend nur der Grobwurzelbereich (> 5 mm Durchmesser) im Mittelpunkt des Interesses stand. Im Zusammenhang mit der Übertragung der Apfeltriebsucht liegen einige weitere Untersuchungen über

Wurzelverwachsungen vor (u.a. Ciccotti et al. 2008, Lešnik et al. 2008). Für die Ausbreitung von ApMV in Haselnussanlagen wird die mögliche Rolle von Wurzelkontakten mit Unkräutern als Wirtspflanzen diskutiert (Arli-Sokmen et al. 2005). Eine weitere prinzipielle Möglichkeit der vektorlosen Übertragung stellt die Bodenlösung dar. Eine Reihe pflanzenpathogener Viren wurde bisher in wässriger Umgebung wie Flüssen, Bächen und Seen oder in Bewässerungssystemen nachgewiesen, wobei es sich dabei größtenteils um stabile Viren wie das *Tomatenmosaikvirus* (ToMV), *Tabakmosaikvirus* (TMV) oder *Carnation ringspot virus* (CRSV) handelte; eine Übersicht dazu findet sich bei Mehle und Ravnkar 2012. Als Virusherkeunft sind die Wurzeln infizierter Pflanzen naheliegend; für mehrere Viren konnte dies bereits in den 60er Jahren nachgewiesen werden (Smith et al. 1969). Infektionsversuche mit einigen dieser Viren in wässrigen Systemen führten zur erfolgreichen Übertragung auf gesunde Pflanzen (u.a. *Pelargonium flower break virus* (PFBV), Krczal et al. 1995 oder *Tomatenmosaikvirus* (ToMV), (Kramberger et al. 2004)). Die meisten Mitglieder der Gattung *Tombusvirus* sind bodenbürtig ohne einen Vektor (Roberts 2014). So konnten Kegler et al. (1980) mit einem Virus aus dieser Gattung (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) an Apfel die vektorlose Übertragung im Boden von kranken auf gesunde Pflanzen nachweisen. Auch innerhalb der Gattung *Carmovirus* gibt es einige bodenbürtige Viren wie das *Cucumber soil.borne mosaic virus* und *Galinsoga mosaic virus*, die keine bekannten Vektoren haben (Roberts 2014).

Speziell für die hier untersuchten Apfelviren ACLSV, ApMV, ASGV und ASPV, die jeweils verschiedenen anderen Gattungen angehören (*Trichovirus*, *Ilarvirus*, *Capillovirus* bzw. *Foveavirus*) liegen noch keine entsprechenden Erkenntnisse vor.

2.2 Nachweismöglichkeiten von Apfelviren im Jahresverlauf

Der Nachweis diverser Apfelviren mittels PCR wurde in der Literatur bereits häufiger beschrieben, auch für unterschiedliche Probenahmezeitpunkte im Jahr oder für verschiedene Gewebearten (u.a. Artjnjen 2013, Kundu et al. 2003, Menzel et al. 2002). Eine über mindestens einen Jahreszyklus durchgängige Untersuchung für alle latenten Apfelviren und deren jeweilige Verdünnungsgrenzen im Sinne eines jahreszeitlichen „Testkalenders“, wie er von Fuchs et al. (1988) für den serologischen ELISA-Nachweis der wichtigsten Kern- und Steinobstviren entwickelt wurde, fehlte jedoch bislang. Vor allem die Abschätzung, ob zu bestimmten Zeitpunkten im Jahresverlauf eine kritische Untergrenze für den Nachweis einzelner oder aller Viren gleichzeitig vor allem bei Mischproben eintreten kann, war mit den bislang vorliegenden Literaturberichten nicht möglich.

2.3 Eintragsquellen von Apfelviren und Phytoplasmen in Reisermuttergärten mit Pflanzmaterial

Untersuchungen aus 2010 und 2011 belegten, dass Virusbefall an Pflanzen aus einigen zertifizierten Unterlagenbeständen vorhanden war, die bislang als virusfrei eingestuft waren (Jelkmann, pers. Mitteilung). Hierbei konnte angenommen werden, dass das Ausgangsmaterial bereits virusinfiziert für die Aufpflanzung in den Vermehrungsquartieren bezogen wurde. Bei den in zwei deutschen Reisermuttergärten

im Zeitraum 2010 bis 2012 aufgetretenem Befall mit Apfeltriebsucht und Birnenverfall, die als Quarantänekrankheiten eingestuft sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Infektionen zumindest teilweise bereits mit Pflanzmaterial eingeschleppt wurden. Eingangstestungen finden aus Kosten- und/oder Zeitgründen zumeist nicht oder nur im Verdachtsfall statt.

2.4 Optimierung der Nachweismöglichkeit von Birnenverfall im Jahresverlauf

In den Laboren des deutschen Pflanzenschutzdienstes werden unterschiedliche Kombinationen der üblichen Extraktions- und Nachweisverfahren für die Untersuchung auf den Birnenverfall eingesetzt. Der Nachweis des Birnenverfalls gestaltet sich dabei oft schwierig, da sich trotz offensichtlich symptomatischen Befalls der Erreger oftmals nicht nachweisen lässt. Vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen Extraktions- und Nachweisverfahren in Kombination mit verschiedenen Probenahmemengen über mindestens einen Jahreszyklus an verschiedenen Unterlagen-/Edelsortenkombinationen mit dem Ziel einer verbesserten Detektionsrate lagen bisher nicht vor.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungen zur Bodenübertragbarkeit von Apfelviren

3.1.1 Topfversuche

Für die Topfversuche mit den Apfelviren wurde die Unterlage ‚Bittenfelder‘, zertifiziert, virusfrei (vf), als 1-jährig pikierter Sämling in der Stärke 9-12 verwendet. Die Unterlagen blieben unveredelt. Ein Teil der Unterlagen wurde für die Versuche durch Chip-Inokulation (zwei Chips je Virus, JKI Dossenheim, März 2013) mit je zwei Viren in folgender Kombination künstlich infiziert: ASPV/ASGV sowie ACLSV/ApMV. Die verwendeten Virusstämme waren ASGV: Gambach (41/85), ASPV: PB66 (40/85), ACLSV: Uhl (38/85); ApMV: (41/87). Vom JKI wurden die inokulierten Bäume in Klasmann Tonsubstrat getopft bezogen. Der Erfolg der Inokulation wurde später wiederholt mit Hilfe der PCR überprüft (s. Ergebnisteil). Der andere Teil wurde unbehandelt als Gesundheitskontrolle verwendet und bei Versuchsbeginn stichprobenartig auf die Abwesenheit der im Versuch eingesetzten Viren untersucht. Die Sämlinge gelten aufgrund der Nichtübertragbarkeit der Viren durch Samen und Vektoren à priori als virusfrei.

Als Boden für die Topfversuche wurde ein gesiebter, pasteurisierter Mutterboden verwendet (70 °C, 20 min.). Der Boden wurde hinsichtlich bestimmter Parameter, die einen wesentlichen Einfluss auf die Virusadsorption haben können (Humusanteil, Tongehalt, pH-Wert, s. Tab.1), im hausinternen Bodenlabor des LTZ analysiert.

Tab. 1: Merkmale der verwendeten Bodenart für die Topfversuche

Bodenart	Humusgehalt %	Tongehalt %	pH-Wert
Stark lehmiger Sand (IS)	2,2	12,2	6,3

Die Topfversuche wurden mit Hilfe einer Tröpfchenbewässerung versorgt, der ein Flüssigdünger zugesetzt war (ca. 4% Hakaphos soft Basis und ca. 2,5 % Novatec). Die Töpfe wurden zunächst in einem Folientunnel deponiert, später auf eine Freifläche, die mit einer wasserdurchlässigen Unkrautfolie aus Bändchengewebe abgedeckt war, umgesetzt. Zum Überwintern wurden die Bäume in ein unbeheiztes Gewächshaus erbracht.

Für die Untersuchung einer Bodenübertragbarkeit der Viren wurden drei verschiedene Topfversuche mit je sechs Wiederholungen angelegt (siehe 3.1.1.1- 3.1.1.3).

Für die Virusuntersuchungen wurden je Baum zufallsverteilt i.d.R. jeweils fünf Blätter entnommen und als Mischprobe mit der PCR untersucht. Außerhalb der Vegetationszeit wurden stattdessen jeweils fünf Triebstücke verwendet, von denen die Knospen mit einem Rindenanteil untersucht wurden. In der zuletzt durchgeführten Probenahme im August 2016 wurden bei denjenigen Bäumen, die bereits zuvor im Versuchsverlauf viruspositiv getestet waren, je Baum 4 x 5 Blätter entnommen und als vierfache Mischprobe parallel untersucht.

3.1.1.1 Pflanzen ohne Wurzelsperre

Je 20 I-Container wurden im März 2013 insgesamt drei ‚Bittenfelder‘ Unterlagen eingesetzt: Mittig eine künstlich doppelt infizierte Unterlage sowie links und rechts daneben je ein virusfreier Baum (Abb.1). Die Viruskombination ASPV/ASGV bzw. ACLSV/ApMV wurde jeweils in einer separaten Topfreihe angesetzt, insgesamt somit 12 Töpfe. Diese Versuchsanordnung bietet die Möglichkeit direkter Wurzelkontakte zwischen dem virusinfizierten und den gesunden Bäumen im Topf. Probenahmen zur Kontrolle von Virusinfektionen wurden später zu verschiedenen Terminen durchgeführt, sowohl bei den gesund gepflanzten Nachbarbäumen als auch bei den künstlich infizierten Bäumen (s. Ergebnisteil).

3.1.1.2 Pflanzen mit Wurzelsperre

Für diese Versuchsanordnung wurden rechteckige Pflanzgefäße mit ca. 45 l Inhalt verwendet und die Pflanzen darin im Juli 2013 deponiert. Die virusinfizierte Pflanze wurde separat in ein 10 l Pflanzgefäß aus Kunststoff gesetzt, welches mit 100 Bohrungen (2 mm ø) für den Durchtritt von Wasser bzw. Bodenlösung versehen wurde. Als Wurzelsperre wurden zwei Polyamidgewebe mit unterschiedlichen Maschenweiten verwendet. Die technischen Daten der Gewebe sind in Tab. 2 zusammengestellt (Herstellerangaben Fa. Saati).

Tab. 2: Technische Spezifikation der verwendeten Kunststoffgewebe als Wurzelsperre

Gewebetyp	Material	Maschenweite	Gewebedicke	Reißfestigkeit	Reißdehnung
PA 250/39	Polyamid 6.6 Monofil	250 μ	280 μ	1100 N/ 5 cm	33/40 %
PA 80/32	Polyamid 6.6 Monofil	80 μ	110 μ	500/535 N/ 5 cm	43 %

Die Anordnung der Netzgewebe war wie folgt: Außen war der Topf mit einem Netz mit 250 μ m Maschenweite lose umhüllt umgeben. In den Topf wurden beide Netztypen lose übereinander (80 μ m-Netz unten, 250 μ m-Netz oben) eingelegt, die bis über den Topfrand reichten. Darin wurde dann der virusinfizierte Baum wurzelnackt eingesetzt und mit dem Versuchsboden verfüllt. Dieser Topf wurde anschließend mittig in dem rechteckigen Versuchsgefäß positioniert und jeweils ein gesunder Baum links und rechts daneben gepflanzt (Abb. 1). Von den Wurzeln des künstlich virusinfizierten Baumes in Richtung seiner virusfreien Nachbarpflanzen ergab sich damit folgender Barriereaufbau: 250 μ m Netz \rightarrow 80 μ m Netz \rightarrow Topfwandung mit 2mm-Bohrungen \rightarrow 250 μ m Netz.

Das grobmaschigere Gewebe diente als mechanischer Schutz vor einer eventuellen Zerstörung des dünnen feinmaschigeren Gewebes durch das Baumwurzelwachstum. Als wasserdurchlässiges und flexibles Gewebe mit einer möglichst kleinen Maschenweite war zu vertretbaren Kosten nur das 80 μ m-Netz am Markt verfügbar. Durch dieses feinmaschige Gewebe wäre nur ein direkter Wurzelkontakt zwischen dem virusinfizierten und seinen virusfrei gepflanzten Nachbarbäumen im Feinstwurzelbereich möglich. Feinstwurzeln sind nach ZVT-Baumpflege im Durchmesser als $< 0,1$ cm definiert, Feinstwurzeln umfassen den Bereich von 0,1 bis 0,5 cm (Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau 2006).

Die Probenahmen an den Bäumen zur Untersuchung auf Virusinfektionen erfolgten wie unter 3.1.1 genannt.



Abb. 1: Anordnung der künstlich virusinfizierten (mittig) und virusfrei gepflanzten Versuchsbäume (seitlich) in den Pflanzbehältern; links ohne, rechts mit Wurzelsperre

3.1.1.3 Infektionsversuch über zugesetztes Bodeneluat

Für diesen Versuch wurden jeweils zwei nicht virusinfizierte ‚Bittenfelder‘ Unterlagen im März 2013 in einen 20 l Container gepflanzt (sechs Wiederholungen). Als Erde wurde

dieselbe wie für die anderen Topfversuche verwendet. Nach ca. 16,5 Monaten Standzeit (Juli 2014) wurden je Topf ca. 750 ml Bodeneluat zugesetzt, welches unmittelbar zuvor aus dem Versuchsteil 3.1.1 (Topfversuch ohne Wurzelsperre) folgendermaßen gewonnen wurde: Allen 12 Töpfen wurden jeweils ca. 1,25 – 1,5 l entmineralisiertes Wasser zugesetzt, die durchlaufende Bodenlösung (ca. 800 – 900 ml je Topf) aufgefangen und eine Teilmenge von ca. 400 ml für eine spätere Untersuchung auf das Vorhandensein derjenigen Viren, mit denen die Bäume künstlich infiziert waren, eingefroren. Als Kontrolle wurde eine Probe des verwendeten Wassers mit untersucht. Die restlichen 400-500 ml wurden mit den Eluaten aus allen anderen Gefäßen dieses Versuchsteils vereinigt und als Mischlösung für diesen Versuch verwendet.

Bereits im September 2013 (nach sechs Monaten Standzeit) wurde allen Töpfen jeweils ca. 1,25 l Leitungswasser zugesetzt, die durchlaufende Bodenlösung (ca. 800 ml je Topf) aufgefangen und für eine spätere Untersuchung auf das Vorhandensein derjenigen Viren, mit denen die Bäume künstlich infiziert wurden, eingefroren. Die Untersuchung von je drei Eluaten aus beiden Viruskombinationen (ASPV/ASGV bzw. ACLSV/ApMV) erfolgte wie unter 3.1.3 beschrieben.

Für die Analyse auf frei vorhandene Viruspartikel im Eluat wurden je Viruskombination (ASPV/ASGV bzw. ACLSV/ApMV) drei Wiederholungen verwendet (also insgesamt 6 Proben). Die Eluate wurden nach dem Auftauen aufgeschüttelt, davon 200 ml in 4x50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und die Bodenteilchen für 20 min bei 6000 U (= 6641 g) bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und anschließend mit ca. 159.000 g bei 12 °C ultrazentrifugiert (am JKI Dossenheim). Durch die Aufteilung in mehrere zeitlich gestaffelte Chargen lagen die Zentrifugationszeiten zwischen 7,5 und 20 h. Das Sediment wurde anschließend in 3 ml Silica-Extraktionspuffer aufgenommen und mit demselben RNA-Extraktionsverfahren und der PCR wie bei den Virusuntersuchungen aus Pflanzenmaterial untersucht. Eine schematische Darstellung der Methodik ist in Abb. 1 wiedergegeben. Als Positivkontrolle wurden 200 ml Eluat verwendet, dem jeweils Rohextrakt aus viruspositiven Versuchspflanzen ASPV/ASGV bzw. ACLSV/ApMV) zugesetzt wurde. Zur Gewinnung des Rohextraktes wurden ca. 300 mg Knospen- und Rindengewebe im Verhältnis 1:10 mit ELISA-Probenpuffer extrahiert, das Mazerat 10 min bei 13.000 U zentrifugiert (Tischzentrifuge) und vom Überstand dann 1 ml zum Eluat gegeben. Die Probenahmen von Blättern zur Untersuchung auf mögliche Virusinfektionen erfolgten wie unter 3.1.1 beschrieben.

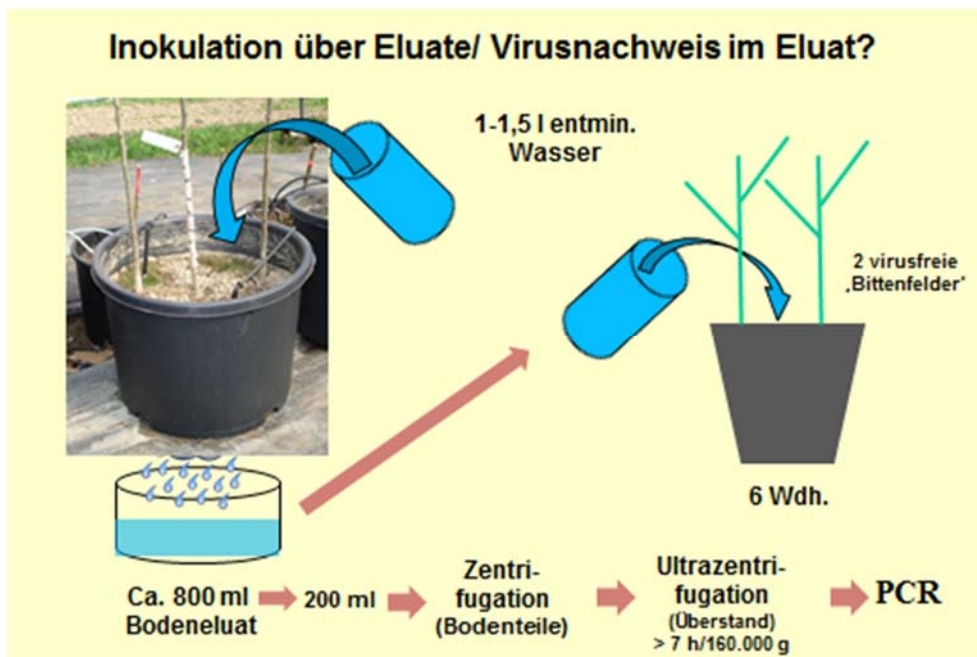


Abb. 2: Schematische Darstellung der Gewinnung des Bodeneluats, des Infektionsversuchs an virusfreien ‚Bittenfelder‘ sowie der Untersuchung auf Viruspartikel durch Ultrazentrifugation

3.1.2 Freilanduntersuchungen

3.1.2.1 Aufpflanzversuch

Für den Freilandversuch wurden künstlich doppelt infizierte ‚Bittenfelder‘ in derselben Viruskombination wie für den Topfversuch verwendet. Die Aufpflanzung erfolgte im März 2013 in Reihe mit der Abfolge: zwei gesunde (nichtinfizierte), eine virusinfizierte, zwei nichtinfizierte u.s.w. im Abstand von 0,6 m (Abb. 3a). Der Pflanzabstand entspricht dem üblichen Baumabstand innerhalb einer Reihe in Reiserschnittgärten. Die Anzahl der Wiederholungen mit virusinfizierten Bäumen betrug je Viruskombination 10 (plus jeweils ein gesunder Nachbarbaum links und rechts). Künstlich mit ASGV/ASPV inokulierte Bäume, bei denen sich nach der 1. Kontrolltestung im Juni 2013 noch keines dieser Viren nachweisen ließ, wurden im August 2013 mit je zwei Chips von viruspositiven Reservebäumen nachinokuliert.

Der Freilandversuch wurde am Rand der Obstversuchsanlage des LTZ Augustenberg in Karlsruhe gepflanzt. Der Boden wurde hinsichtlich wichtiger Parameter analysiert, die einen wesentlichen Einfluss auf die Virusadsorption haben können (v.a. Humusanteil, Tongehalt, pH-Wert, s. Tab. 3).

Tab. 3: Bodenmerkmale der im Aufpflanzversuch mit künstlich virusinfizierten Bäumen bepflanzten Fläche

	Bodenart	Humusgehalt %	Tongehalt %	pH-Wert
Freilandversuch	Schluffiger Lehm (uL)	2,8	13,1	6,9

In diesem Versuch wurde parallel zur Baumreihe (Wechsel zwischen infizierten/nicht infizierten Bäumen) im März 2014 eine zusätzliche Reihe virusfreier ‚Bittenfelder‘ Sämling (1-jährig) gepflanzt. Der Reihenabstand betrug 1,35 m, der Abstand in der Reihe 0,60 m (Abb. 3b). Da das Gelände eine leichte Hangneigung von ca. 5%

aufweist, wurde die zusätzliche Reihe unterhalb der bereits bestehenden angelegt. Damit sollte die Frage untersucht werden, ob mit der hangabwärts gerichteten Wasserbewegung im Boden gegebenenfalls Viren aus dem Wurzelraum der oberhalb stehenden infizierten Bäume transportiert und zur Infektion der gesunden Bäume führen können.

Die Probenahmen zur Untersuchung auf Virusinfektionen erfolgten wie unter 3.1.1 beschrieben.

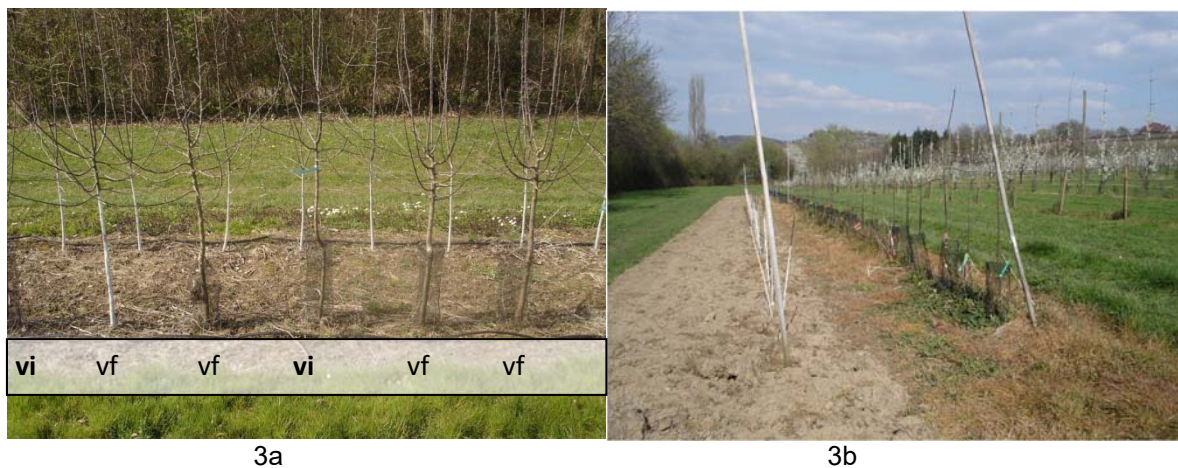


Abb. 3: Anordnung der Bäume im Aufpflanzversuch: a: künstlich virusinfizierte ‚Bittenfelder‘ mit jeweils einem virusfreien gepflanzten Nachbarbaum (links/rechts); b: Zusätzliche Reihe unterhalb mit nur virusfrei gepflanzten ‚Bittenfelder‘. vf =virusfrei gepflanzt, vi = virusinfiziert gepflanzt

3.1.2.2 Nachpflanzversuch

Im April 2014 wurde im Reiserschnittgarten Baden-Württemberg bei drei virusinfizierten Sorten jeweils mehrere nebeneinander stehende Bäume gerodet und einige Tage später in dem betreffenden Bereich jeweils fünf gesunde ‚Bittenfelder‘ Unterlagen (1- 2-jährig) mit ca. 60 cm Pflanzabstand nachgepflanzt. Die gerodeten Bäume hatten eine Standzeit von 5 bzw. ca. 7,5 Jahre (Unterlage ‚Bittenfelder Sämling‘). Die Sorten waren mit folgenden Viren infiziert:

‚Idared‘: ASGV

‚Purpurroter Cousinot‘: ACLSV

‚Stina Lohmann‘: ACLSV und ASPV

Bäume mit einer ApMV-Infektion wurden nicht vorgefunden und fehlen deshalb in diesem Versuch. Eine schematische Darstellung der Versuchsanlage ist Abb. 4 zu entnehmen. Probenahmen zur Untersuchung auf Virusinfektionen erfolgten wie unter 3.1.1 genannt nach ca. 6, 17,5 und 24 Monaten. Die Bodenart war ein schluffiger Löss mit 4% Humusanteil und einem pH-Wert von 7,4.

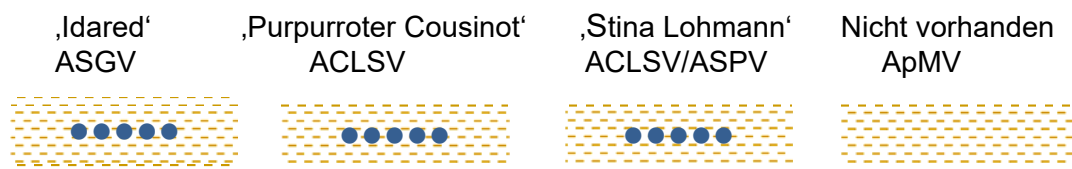


Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung im Nachpflanzversuch

3.1.2.3 Untersuchungen zur Virusverteilung in einem Unterlagenquartier

In einem Baumschulbetrieb stand für die Untersuchung ein sechs Jahre altes Quartier mit vier verschiedenen Unterlagentypen (M 9, M 11, M 26 und MM111) zur Verfügung. Der Pflanzabstand in der Reihe betrug ca. 30 cm, zwischen den Reihen ca. 75 cm.

Zum Auffinden von Unterlagen mit natürlicher Virusinfektion wurden in den Reihen zunächst ca. alle 5 m je fünf Blätter einer Pflanze (zufällig verteilt) entnommen und die Pflanze markiert. Bei einem 2. Probenahmetermin wurden im Fall zuvor viruspositiv getesteter Pflanzen die benachbarten Pflanzen in einem Umkreis von ca. 1 m untersucht. Dies betraf i.d.R. drei Pflanzen links und rechts innerhalb der Reihe sowie jeweils drei Pflanzen in der linken und rechten Nachbarreihe; teilweise waren hier Fehlstellen vorhanden. Die Proben wurden wie unter 3.5.1 beschrieben mit der PCR untersucht.

3.2 Nachweismöglichkeit im Jahresverlauf

In einem Reiserschnittgarten wurden aus den Untersuchungen zur Virusverteilung im Bestand (s. 3.1.2.2.2) insgesamt 12 natürlich virusinfizierte Bäume ausgewählt, die für regelmäßige Untersuchungen zur Erstellung eines Testkalenders vorgesehen wurden.

Die Bäume (je vier Wiederholungen) gehörten folgenden Sorten an (in Klammern die vorgefundenen Viren): ‚Stina Lohmann‘ (ACLSV), ‚Idared‘ (ASGV), ‚Roter von Simonff‘ (ASPV). Bäume mit einer ApMV-Infektion wurden im Reiserschnittgarten nicht gefunden, stattdessen wurden 4 Bäume mit künstlicher Infektion aus dem Freilandversuch (3.1.2.1) hinzugenommen.

Je Baum wurden in etwa monatlichem Abstand fünf Blätter (Mai – Oktober) bzw. Triebstücke (November bis April) zufallsverteilt entnommen. Im Dezember 2014 standen aus dem Reiserschnittgarten keine Proben zur Verfügung, im Februar 2015 für die Untersuchungen auf ACLSV, ASGV, ASPV jeweils nur ein Triebstück je Baum. Bei den Blättern wurden die Blattstiele mit einem Teil Blattgewebe extrahiert, bei den Triebstücken waren es Knospen und Rinde einschließlich Phloem, jeweils 900 mg/Probe, die jeweils als Mischprobe für eine Extraktion verarbeitet wurden. Die Blätter wurden in der Regel frisch extrahiert, im Ausnahmefall auch einmal nach dem Einfrieren.

Von dem ersten Extrakt (= 1:10, d.h. 1 Teil Pflanzengewebe + 9 Teile Puffer) wurden folgende weitere Verdünnungsstufen angefertigt: 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000. Als Verdünnungsmedium wurde der 1:10-Extrakt aus einer Gesundheitskontrolle verwendet. Beim ASGV wurden aufgrund in Voruntersuchungen festgestellter geringer Konzentrationen zusätzliche Verdünnungsstufen von 1:25, 1:50, 1:75 hergestellt. Alle Verdünnungen wurden mit der qualitativen PCR mit dem Ziel untersucht, die höchste Verdünnungsstufe zu ermitteln, die bei visueller Auswertung noch einen eindeutigen Nachweis erkennen lässt.

Für den Virusnachweis im Gewebevergleich (Auge/Rinde) wurden aus dem Topfversuch mit Wurzelsperre (3.1.1.2.) im Januar 2015 je zwei Triebstücke mit Knospen von den künstlich virusinfizierten Pflanzen aus den Wiederholungen 1-3 jeder

Viruskombination entnommen und je Pflanze als Mischprobe auf ACLSV/ApMV bzw. ASGV/ASPV untersucht. Für die Extraktion wurden jeweils 300 mg Rinden- und Knospengewebe verwendet und mit der PCR analysiert.

3.3 Optimierung des Nachweises von Birnenverfall im jahreszeitlichen Verlauf

Diese Untersuchungen konnten aufgrund des Quarantänestatus des Erregers nicht an Reiserschnittbäumen in einem regulären (kommerziellen) Reiser Muttergarten durchgeführt werden. Ersatzweise wurden deshalb jüngere Birnenbäume, die in Spindelform erzogen waren, in der obstbaulichen Versuchsanlage des LTZ ausgewählt. Das Baumalter betrug zu Versuchsbeginn ca. 5 Jahre. Früchte wurden kurz nach dem Fruchtansatz entfernt. In Voruntersuchungen (Mitte November 2012 bis Januar 2013) wurden mit der nested PCR zunächst Bäume identifiziert, die eine natürlichen Infektion mit dem Erreger des Birnenverfalls (*Candidatus phytoplasma pyri*) aufwiesen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden drei verschiedene Sorten/-unterlagenkombinationen mit je drei Wiederholungen ausgewählt: ‚Xenia‘ auf ‚Quitte A‘, ‚Conference‘ auf ‚Sydo‘ und die Nummernsorte ‚48-40-95‘ (Hochschule Geisenheim) auf (vermutlich) ‚Pyrodwarf‘. Von Januar 2014 bis Mai 2015 wurden von diesen Bäumen in etwa monatlichem Abstand jeweils fünf ca. 5-10 cm lange Triebabschnitte zufallsverteilt entnommen. Bis zur DNA-Extraktion wurden diese im Kühlschrank bei ca. 8 °C in Plastiktüten gelagert (1-10 Tage). Die fünf Triebabschnitte je Baum wurden zufallsverteilt in zwei Mischproben mit jeweils drei bzw. zwei Abschnitten aufgeteilt und dann mit zwei unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren aufgearbeitet:

1. Das Silica-Verfahren wie bei Menzel et al. (2002) beschrieben (s.u. 3.5.1).
 2. das Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Art.-Nr. 69104) nach Angaben des Herstellers
- Als Probenmaterial wurden Phloempräparationen von meist einjährigen Trieben verwendet. Das Phloemgewebe für jedes Extraktionsverfahren wurde dabei zwar von denselben Triebstücken, aber an unterschiedlichen Stellen entnommen, da eine Homogenisierung und anschließende Aufteilung für beide Extraktionsverfahren praktisch kaum möglich gewesen wäre.

3.4 Überprüfung möglicher Phytoplasmen-Eintragungen durch Pflanzmaterial in einen Reiserschnittgarten

Von Pflanzmaterial, welches zur Aufpflanzung in einen Reiserschnittgarten gelangte, wurden kurz nach der Pflanzung entweder drei Triebstücke oder vor der Pflanzung zwei bis drei Wurzelstücke und ein Triebstück je Pflanze entnommen und als Mischprobe je Pflanze mit der PCR und teilweise zusätzlich mit der RT-LAMP untersucht (s. 3.5).

3.5. Molekularbiologische Nachweisverfahren

3.5.1 Nukleinsäureextraktion

Zur Nukleinsäureextraktion wurde in allen Untersuchungen (Viren und Phytoplasmen) das Silica-Verfahren wie bei Menzel et al. (2002) beschrieben verwendet, jedoch mit 300 mg Phloemgewebe und 3,0 ml Extraktionspuffer (anstatt 100 mg Gewebe und 1 ml Puffer), soweit nicht anders angegeben. Da i.d.R. immer Mischproben von einem Baum für eine Extraktion verwendet wurden, ermöglichte die dreifache Probenmenge die Verwendung größerer Gewebeanteile von den einzelnen Blättern bzw. Trieb- oder Wurzelstücken und erwies sich als praktischer zu handhaben.

Im Falle des DNeasy plant mini kit waren nach Herstellerangaben max. 100 mg Pflanzengewebe je Probengefäß einsetzbar.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Mischprobengrößen (Gewebe aus drei bzw. zwei Triebabschnitten) wurden je Mischprobe jeweils die angegebenen mg-Mengen verwendet.

3.5.2 Viren

Der Virusnachweis erfolgte modifiziert mit der Multiplex RT-PCR-Methode nach Menzel et al. (2002). In der Originalmethode wird eine simultane zweifache Multiplex-PCR in der Primerkombination ACLSV/ASGV (Multiplex I) bzw. ASPV/ApMV (Multiplex II) empfohlen. Da die Versuchsbäume jedoch in einer getauschten Viruskombination (ACLSV/ApMV bzw. ASGV /ASPV) inokuliert waren, wurde die PCR zunächst mit dieser angepassten Primerkombination durchgeführt. Diese Änderung führte jedoch zu einer verminderten Detektion von ASGV, wie sich später bei einer Kontrolluntersuchung der künstlich infizierten Bäume zeigte. Offensichtlich wird der ASGV-Nachweis in Kombination mit ASPV bei der PCR-Reaktion supprimiert und das Virus somit nicht mehr zuverlässig detektiert. Bei der anderen getauschten Kombination ApMV/ASGV ergab sich dagegen kein Hinweis auf eine verminderte Detektion eines der beiden Viren. Deshalb wurde die PCR ab März 2014 dann in Form einer einfachen Multiplex-PCR (ACLSV/ApMV), sowie zwei separaten PCR (jeweils für ASPV und ASGV) durchgeführt. Da die Nukleinsäureextrakte früherer Untersuchungen noch eingefroren zur Verfügung standen, konnten diese dann mit dem geänderten Verfahren nochmals nachträglich untersucht werden, was bei ursprünglich negativen Resultaten für ASGV dann meist zu einem Virusnachweis führte. Bei den Ergebnissen bis März 2014 sind nur die Resultate dieser wiederholten PCR-Analyse dargestellt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte in einem 1,2 % Agarosegel bei 75 V mit Ethidiumbromid als DNA-Farbstoff und anschließender visueller Auswertung unter UV-Licht.

3.5.3 Phytoplasmen

Für den DNA-Nachweis von Phytoplasmen (Apfeltriebsucht und Birnenverfall) kamen zum Einsatz:

1. Qualitative nested PCR mit der Primerkombination P1/P7 und U3/U5, wie bei Lorenz et al. (1995) beschrieben. Für die erste Amplifikation mit P1/P7 wurde 1 µl DNA-Extrakt zu 24 µl Reaktionsmix gegeben, für die 2. Amplifikation 0,5 µl des Amplifikats aus der 1. Amplifikation zu 24,5 µl Reaktionsansatz.

2. Realtime-LAMP (Rt-LAMP) nach Nußbaum (2013), welches mit speziell für die AP-Gruppe entwickelten Primern arbeitet und auf einem real-time Cyclus durchgeführt wurde. 2 µl DNA-Extrakt wurden zu 20 µl Mastermix gegeben.

3. Die real-time PCR nach Nicolici et al. (2010). Hierbei wurden 5 µl DNA-Extrakt zu 20 µl Reaktionsansatz hinzugefügt.

Kurzfristig kam auch das Blue LAMP-Verfahren nach Neumüller et al. (2014) zum Einsatz; der fertige Mastermix wurde von den Autoren bezogen.

Die LAMP-Verfahren beruhen auf der erstmals von Notomi et al. (2000) beschriebenen Methode. Sowohl die Rt-LAMP als auch die real-time PCR wurden mit dem „Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System“ durchgeführt.

Für den Vergleich der Nachweisverfahren wurde jeweils der derselbe Silicagel-DNA-Extrakt herangezogen.

3.5.4 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Phytoplasmen mittels Sequenzierung wurden PCR-Produkte der Proben mit einem positiven Pear decline Phytoplasmen-Befund herangezogen. Mit den Primern P1-P7/fU5-rU3 wurde mittels nested PCR ein Fragment aus dem Bereich des 16S rRNA-Gens amplifiziert. Nach der Reinigung der Amplifikate mit dem Wizard PCR Clean Up System (Fa. Promega) wurden die Sequenzierreaktionen mit den Vorwärts- und Rückwärtsprimern fU5/rU3 durchgeführt. Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit dem Säulensystem DyeEx 2.0 Spin Kit (Fa. QIAGEN) gereinigt und auf dem Sequenzer ABIPrism 310 sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Software „DNASTAR Lesergene v. 12.1“ und die Identifizierung mittels NCBI-Datenbank.

Zur Bestimmung der Viren-Arten mittels Sequenzierung wurden PCR-Produkte der Proben mit einem positiven Befund herangezogen. Mit den entsprechenden Primern für ApMV-s/-as, ACLSVs/-as, ASPV und ASGV wurden PCR-Fragmente aus dem Bereich der mRNA für coat proteine Gen (cp Gen) amplifiziert. Nach der Reinigung der Amplifikate mit dem Wizard PCR Clean Up System (Fa. Promega) wurden die Sequenzierreaktionen mit den Vorwärts- und Rückwärtsprimern durchgeführt.

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit dem Säulensystem DyeEx 2.0 Spin Kit (Fa. QIAGEN) gereinigt und auf dem Sequenzer ABIPrism 310 sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Software „DNASTAR Lesergene v. 12.1“, die Identifizierung mittels NCBI-Datenbank.

3.5.5 Nematoden

Bodenproben wurden im August 2016 mit Hilfe eines Bohrstocks im Topfversuch durch drei ca. 20 cm tiefe Einstiche bis zum Topfboden gewonnen, im Freilandversuch durch zwei ca. 55 cm tiefe Einstiche im Umkreis von ca. 40 cm vom Baumstamm. Dabei wurden Bodenmengen zwischen ca. 160 und 200 g (Topfversuch) bzw. 320 g

Feuchtgewicht (Aufpflanzversuch) gewonnen. Die Untersuchung auf virusübertragende Nematodenarten erfolgte durch die Bodenextraktion einer Teilmenge von 100g mit einer Baermann-Trichteranlage und anschließend mikroskopische Bestimmung.

4. Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Topf- und Freilanduntersuchungen zur Bodenübertragung

4.1.1 Topfversuche mit/ohne Wurzelsperre

Die Ergebnisse der Überprüfungen der künstlich virusinokulierten Versuchsbäume auf eine erfolgreiche Virusinfektion als notwendige Voraussetzung für die Versuchsanordnung sind in Tab. 4a und 4b wiedergegeben.

Tab. 4a: Nachweis von ACLSV, ApMV, ASGV und ASPV in künstlich infizierten ‚Bittenfelder‘ Bäumen im Topfversuch (ohne Wurzelsperre) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (8.3.2013). * Baum mit je zwei Chips (ASGV/ASPV-positiv) am 8.8.2013 nachinokuliert. + = viruspositiv, - = virusnegativ, ¹⁾ Baum im April 2014 ersetzt, ²⁾ Baum im Frühjahr 2014 abgestorben und im Juni 2014 ersetzt.

Datum Probe- nahme Wieder- holung Nr.	ACLSV		ApMV		ASGV				ASPV			
	10.6. 2013	13.10. 2015	10.6. 2013	13.10. 2015	11.6. 2013	9.10. 2013	11.12. 2013	13.10. 2015	11.6. 2013	9.10. 2013	11.12. 2013	13.10. 2015
Topf 1	+	+	+	+	- *	+	+	+	+	+	+	+
Topf 2	+	+	+	+	- *	-	- ¹⁾	+	+	+	+	+
Topf 3	+	+	- ¹⁾	+	- *	+	- ²⁾	+	+	+	+ ²⁾	+
Topf 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topf 5	+	+	+	+	- *	-	+	+	+	+	+	+
Topf 6	+	+	+	+	- *	-	- ¹⁾	+	+	+	+	+

Tab. 4b: Nachweis von ACLSV, ApMV, ASGV und ASPV in künstlich infizierten ‚Bittenfelder‘ Bäumen im Topfversuch (mit Wurzelsperre) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (8.3.2013). * Baum mit je zwei Chips (ASGV/ASPV-positiv) am 8.8.2013 nachinokuliert + = viruspositiv, - = virusnegativ, ¹⁾ Baum im April 2014 ersetzt.

Datum Probe- nahme Wieder- holung Nr.	ACLSV		ApMV		ASGV				ASPV			
	10.6. 2013	13.10. 2015	10.6. 2013	13.10. 2015	11.6. 2013	9.10. 2013	11.12. 2013	13.10. 2015	11.6. 2013	9.10. 2013	11.12. 2013	13.10. 2015
Topf 1	+	+	+	+	-*	+	+	+	+	+	+	+
Topf 2	+	+	+	+	-*	-	+	+	+	+	+	+
Topf 3	+	+	+	+	-*	+	-	+	+	+	+	+
Topf 4	+	+	- ¹⁾	+	-*	+	+	+	+	+	+	+
Topf 5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Topf 6	+	+	+	+	-*	-	+	+	+	+	+	+

Bei den künstlich inokulierten Bäumen im Topfversuch konnten drei Monate nach Inokulation alle Wiederholungen beim ACLSV und ASPV positiv getestet werden, beim ApMV in fünf Wiederholungen, beim ASGV dagegen nur in einer Wiederholung. Auch sechs Monate nach der Erstinokulation und zwei Monate nach der Nachinokulation gelang beim ASGV nur in der Hälfte der Bäume ein Virusnachweis; weitere zwei Monate später (Dezember 2013) waren 2/3 der Bäume nachweislich mit ASGV infiziert. Ein Austausch der bis dahin virusnegativen Bäume durch viruspositiv getestete Reservebäume im April 2014 stellte sicher, dass zumindest ab diesem Zeitpunkt im Topfversuch mit und ohne Wurzelsperre in allen Wiederholungen für ASGV ein viruspositiver Baum vorhanden war.

Die Untersuchungsergebnisse für die Nachtestungen der virusfrei gepflanzten Nachbarbäume in den Gefäßen auf mögliche Virusinfektionen sind in Tab. 5 dargestellt. Insgesamt ergaben sich im Versuchszeitraum in 5 von insgesamt 24 Gefäßen ein- oder mehrmalig positive PCR-Reaktionen an den Probenahmeextrakten der virusfrei gepflanzten Nachbarbäume, davon vier im Versuch ohne Wurzelsperre und einer im Versuch mit Wurzelsperre. Teilweise fielen die PCR-Banden dabei nur schwach aus. Eine erstmalige Reaktion erfolgte nach knapp 18 Monaten Standzeit in einer von sechs Wiederholungen in der Variante ohne Wurzelsperre für ApMV und ACLSV. Außer in zwei Fällen (ACLSV und ASPV, Variante ohne Wurzelsperre) ließen sich die Nachweise an den Extrakten von späteren Probenahmetermine jedoch nicht mehr wiederholen. Aus diesem Grund wurde bei allen Positivreaktionen (bis einschließlich April 2016) die PCR an den eingefrorenen Nukleinsäureextrakten später wiederholt und die Amplifikate durch eine Sequenzierung hinsichtlich ihrer Virusidentität überprüft. Bis auf einen Fall (ASPV im Mai 2015) ließen sich die Nukleinsäureextrakte erfolgreich amplifizieren und sequenzieren. Die Sequenzhomologien mit den entsprechenden Referenzen in der NCBI-Datenbank lagen für die Viren insgesamt in einem Bereich von 91 bis 98,8 %, diejenigen der Positivkontrollen zwischen 91 und 99,6 %. Bei der letzten Probenahme im August 2016 fiel auf, dass beim ASPV an beiden Nachbarbäumen nur jeweils ein Teil der Mischproben (eine bzw. zwei von vier) viruspositiv waren.

Bis auf eine Ausnahme (ApMV/ACLSV im September 2014) ergaben sich bei den virusfrei gepflanzten Nachbarpflanzen positive PCR-Reaktionen aber immer nur für jeweils ein Virus, obwohl sich in den künstlich infizierten Pflanzen jeweils zwei Viren befanden, die übertragen hätten werden können.

Eine visuelle Kontrolle der Kunststoffnetze am Ende des Versuchszeitraums (September und Oktober 2016) in zwei Versuchsgefäßen ergab, dass Wurzeldurchwachungen vorhanden waren. Am 250 µm-Netz hatte die stärkste Wurzel einen Durchmesser von ca. 1800 µm, ansonsten überwogen Wurzeln mit Durchmessern bis zu ca. 900 µm (Abb. 5). Da keine erkennbaren Risse in den Netzen vorlagen, konnte dies nur durch eine Aufdehnung der Maschen und einer partiellen Einschnürung der Wurzel an der Durchtrittsstelle erfolgt sein.

Tab. 5: Nachtestungen auf ACLSV/ApMV und ASGV/ASPV bei gesund gepflanzten Nachbarbäumen (neben künstlich infizierten stehend) an verschiedenen Probenahmeterminen im Topfversuch. T = Topf-Nr., B = Baum-Nr., + = Virusnachweis, () = schwache Bande, - = kein Virusnachweis, ? = Sequenzierung nicht möglich, * Probenahme (4x5 Blätter/Baum) nur an denjenigen Bäumen, die während der Standzeit mindestens einmal viruspositiv getestet wurden.

Probenahmetermin (Monat/Jahr)	10/13	9/14	5/15	10/15	4/16	8/16 *
Standdauer (ca. Monate) nach Pflanzung	6,5	17,5	26	31	36,5	41
Topfversuch <u>ohne</u> Wurzelsperre	- - - -	ApMV + ACLSV (+) (T1/B2) - - -	- - ACLSV + (T3/B1) - ASPV (+)? (T1/B1+2)	- - ACLSV (+) (T3/B1) - -	- - ACLSV + (T3/B1) ASGV + (T3/B1) -	- - ACLSV (+) (T3/B1) - ASPV (+) (T1/B1+2)
Standdauer (ca. Monate) nach Pflanzung	3	13,5	22	27	32,5	37
Topfversuch <u>mit</u> Wurzelsperre	-	-	-	ACLSV (+) (T2/B2)	-	-



Abb. 5: Wurzeldurchwachungen am Netz mit 250 µm Maschenweite im Bodenbereich eines Pflanzgefäßes. von den virusfreien Nachbarbäumen kommend unterhalb des eingesetzten Topfes im Bodenbereich (Kunststoffgefäß mit dem künstlich virusinokulierten Baum herausgenommen).

Am feinmaschigen Netz mit 80 µm Maschenweite fanden sich nur Feinstwurzeln, die einen geschätzten Wurzeldurchmesser von max. ca. 200 – 300 µm aufwiesen (Abb. 6). Somit wurden nur Wurzeldurchgänge oberhalb dieses Durchmesserbereichs unterbunden, nicht aber darunter.



Abb. 6: Feinstwurzelbesatz am Netz mit 80 μm Maschenweite, welches sich an der Innenwandung eines Kunststoffgefäßes befand, in welchem ein künstlich virusinokulierter Baum wuchs (s. mm-Maßstab als Vergleich). Zwischen diesem Netz und dem Wurzelwerk befand sich zusätzlich ein Netz mit 250 μm Maschenweite.

In Abb. 7 ist erkennbar, dass eine Feinstwurzel mit ca. 13 μm Durchmesser (mikroskopische Vergleichsmessung) das Gewebe passiert hat. Das Netz befand sich an der Innenwandung eines Kunststoffgefäßes, in welchem ein künstlich virusinokulierter Baum gewachsen ist. Zwischen diesem Netz und dem Wurzelwerk befand sich zusätzlich ein Netz mit 250 μm Maschenweite. Die abgebildete Wurzel konnte jedoch nicht eindeutig als Apfelbaumwurzel bestimmt werden, da die Versuchsgefäße zeitweise auch Unkrautbewuchs aufwiesen und eine morphologische Differenzierung der Wurzelarten nicht möglich war.

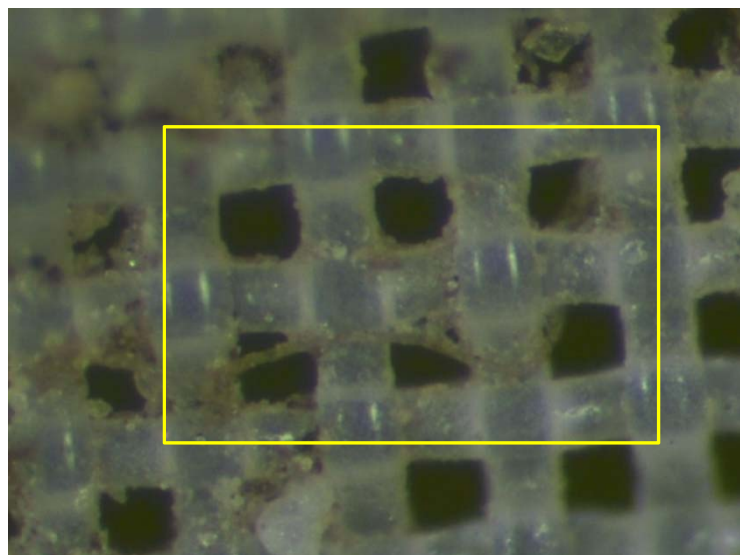


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme (100-fach) einer Feinstwurzel (ca. 13 μm Durchmesser), welche ein Kunststoffnetz mit 80 μm Maschenweite durchwachsen hat.

Die stichprobenartige Untersuchung auf virusübertragende freilebende Nematoden im Boden derjenigen Pflanzgefäße, in denen während des Versuchszeitraumes zumindest einmal eine Virusinfektion bei den Nachbarbäumen nachgewiesen wurde (s. Tab. 5) ergab keinen Nematodennachweis (Probenahme August 2016).

4.1.2 Infektionsversuch über zugesetztes Bodeneluat

Im Topfversuch mit einem Zusatz von Bodeneluat, welches aus Gefäßen mit virusinfizierten Bäumen gewonnen wurde, ließen sich bei mehreren Probenahmeterminen (Mai und Oktober 2015, April 2016, dies entspricht ca. 10, 15, 21 Monate nach Eluatzusatz) keinerlei Virusinfektionen in den virusfrei gepflanzten ‚Bittenfelder‘ nachweisen.

Ebenso ergab die Untersuchung der eingefrorenen Bodeneluat-Proben aus den Jahren 2013 und 2014 aus drei Wiederholungen je Viruskombination keinen Virusnachweis. In den Positivkontrollen, denen Rohextrakt aus virusinfizierten Pflanzen zugesetzt wurde, ließen sich dagegen in allen Fällen die jeweiligen Viren nachweisen.

4.1.3 Aufpflanzversuch

Ebenso wie im Topfversuch wurden auch im Aufpflanzversuch die künstlich virusinokulierten Versuchsbäume wiederholt auf eine erfolgreiche Virusinfektion überprüft (Tab. 6a und 6b). Dabei konnte, ähnlich wie im Topfversuch, ca. drei Monate nach Inokulation nur beim ASGV beim überwiegenden Teil der Pflanzen noch kein Virusnachweis erbracht werden. Vereinzelt Bäume, bei denen nach spätestens neun Monaten nach der Inokulation trotz Nachinokulation noch kein Virusnachweis gelang, wurden nach insgesamt ca. 12 Monaten durch entsprechende Reservebäume ersetzt, die nachweislich mit den entsprechenden Viren infiziert waren (ASGV). Bei der letzten Nachkontrolle (Oktober 2015) ließ sich für alle virusinokulierten Bäume ein viruspositiver Nachweis führen. Auffällig war nur ein Teil der mit ApMV inokulierten Bäume, an denen beim 2. Testtermin kein Virusnachweis gelang, obwohl diese bereits bei der 1. Testung viruspositiv getestet wurden.

Bei beiden künstlich virusinokulierten Bäumen im Aufpflanzversuch, an denen ASGV nicht nachweisbar war und die deshalb im April 2014 ersetzt wurden, wurde die Ausdehnung des Wurzelwerks untersucht. In Abb. 8 wurden die Stämme in 0,6 m Abstand positioniert, wie sie auch im Freiland voneinander entfernt gepflanzt wurden. Da die Fein- und Feinstwurzeln bei der Rodung größtenteils im Boden verblieben sind, kann der Radius des Wurzelwerks auf \geq ca. 30 cm geschätzt werden, so dass erste Wurzelkontakte zwischen zwei benachbarten Bäumen bereits nach einem Standjahr stattgefunden haben können.

Tab. 6a: Testergebnisse für ACLSV und ApMV bei künstlich infizierten ‚Bittenfelder‘ Bäumen im Aufpflanzversuch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (8.3.2013) + = viruspositiv, - = virusnegativ

Datum Probenahme Wiederholung Nr.	ACLSV			ApMV		
	24.6. 2013	14.10. 2013	19.10. 2015	24.6. 2013	14.10. 2013	19.10. 2015
Baum 1	+	+	+	+	+	+
Baum 2	+	+	+	+	+	+
Baum 3	+	+	+	+	+	+
Baum 4	+	+	+	+	-	+
Baum 5	+	+	+	+	-	+
Baum 6	+	+	+	+	-	+
Baum 7	+	+	+	+	-	+
Baum 8	+	+	+	+	-	+
Baum 9	+	+	+	+	+	+
Baum 10	+	+	+	+	-	+

Tab. 6b: Testergebnisse für ASGV und ASPV bei künstlich infizierten ‚Bittenfelder‘ Bäumen im Aufpflanzversuch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (8.3.2013). + = viruspositiv, - = virusnegativ, * Baum mit je zwei Chips (ASGV/ASPV-positiv) am 8.8.2013 nachinokuliert ¹⁾ Baum im April 2014 ersetzt, ²⁾ Baum abgestorben und im Juni 2014 durch viruspositive Reserve ersetzt

Datum Probenahme Wiederholung Nr.	ASGV				ASPV			
	24.6. 2013	14.10. 2013	11.12. 2013	19.10. 2015	24.6. 2013	14.10. 2013	11.12. 2013	19.10. 2015
Baum 1	-*	-	+	+	+	+	+	+
Baum 2	-*	-	- ¹⁾	+	+	+	+	+
Baum 3	-*	+	+	+	+	+	+	+
Baum 4	-*	-	- ¹⁾	+	+	+	+	+
Baum 5	-*	+	+	+	+	+	+	+
Baum 6	+	+	-	+	+	+	+	+
Baum 7	+	+	+ ²⁾	+	+	+	+	+
Baum 8	-*	+	+	+	+	+	+	+
Baum 9	-*	+	+	+	+	-	+	+
Baum 10	-*	+	+	+	+	+	+	+



Abb. 8: Wurzelwerk von zwei gerodeten Bittenfelder Unterlagen (als einjährige gepflanzt) nach 12 Monaten Standzeit (ohne Fein- und Feinstwurzeln), in 60 cm Stammabstand positioniert

Bei den virusfrei gepflanzten Nachbarbäumen ergab sich nur in einem Fall (Nachbarbaum 1 in Wiederholung 10) nach knapp 18 Monaten Standzeit für die Viren ASGV und ASPV ein schwach viruspositives Testergebnis, welches an den folgenden Terminen aber nicht mehr reproduziert werden konnte (Tab. 7). Auch eine Untersuchung dieses Baumes im August 2016, bei dem statt der üblichen Mischprobe aus 5 Blättern nunmehr 4 x 5 Blätter zur Untersuchung kamen, führte zu keinem weiteren Nachweis. Eine nachträgliche Sequenzierung des Amplifikates aus dem Nukleinsäureextrakt vom September 2014 konnte die Virenidentität bestätigen. Unter der Prämisse, dass eine dauerhafte Übertragung nicht nachgewiesen werden konnte, kann die Ereignisrate mit < 10 % angegeben werden.

Tab. 7: Virustestergebnisse bei gesund gepflanzten Nachbarbäumen (neben künstlich infizierten stehend) an verschiedenen Probenahmeterminen im Aufpflanzversuch. B = Baum-Nr., W = Wiederholungs-Nr., + = Virusnachweis, () = schwaches PCR-Signal, - = kein Virusnachweis * Probenahme (4x5 Blätter/Baum) nur an dem Baum, an welchem während der Standzeit mindestens einmal viruspositive Nachweise erfolgten

Probenahmetermin	10/13	9/14	6/15	10/15	4/16	8/16*
Standdauer (ca. Monate) nach Pflanzung	6,5	17,5	26,5	30,5	36	41
Testergebnis	-	ASGV (+) ASPV (+) (W10/B1)	-	-	-	-

Eine Wurzelauflagerung zwischen einem künstlich virusinfizierten und einem virusfrei gepflanzten Nachbarbaum im September 2016 (42 Monate Standzeit) zeigte, dass die Wurzelwerke beider Bäume bei 60 cm Pflanzabstand stark ineinandergreifen und auch mehrfach Überkreuzungen von Schwachwurzeln auftreten, die generell Wurzelverwachsungen ermöglichen würden (Abb. 9).



Abb: 9: Wurzelkreuzungen zwischen zwei ‚Bittenfelder‘ Unterlagen mit 0,6 m Pflanzabstand nach ca. 42 Monaten Standzeit. Rechts künstlich virusinokuliert, links virusfrei gepflanzt.

In der mit ausschließlich virusfreien ‚Bittenfelder‘ nachgepflanzten Reihe konnte innerhalb einer Standzeit von 25 Monaten bei keinem Baum eine Virusinfektion nachgewiesen werden (Testungen nach ca. 6, 19 und 25 Monaten, Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Untersuchung im August 2016 auf die Anwesenheit virusübertragender freilebender Nematoden im Bodenbereich desjenigen künstlich virusinokulierten Baumes, bei dessen Nachbarbaum im September 2014 einmalig ein Virusnachweis erfolgte (s. Tab. 7), ergab keinen Nachweis.

4.1.4 Nachpflanzversuch

In diesem Versuch mit 15 virusfreien ‚Bittenfelder‘ Unterlagen, die in Bodenbereiche nachgepflanzt wurden, auf denen unmittelbar zuvor verschiedene mit ACLSV, ASGV und ASPV/ACLSV infizierte Apfelsorten gewachsen waren, konnte während der gesamten Standdauer von 24 Monaten keine Virusinfektion in den Bäumen nachgewiesen werden (Testung nach 6,5, 17,5 und 24 Monaten). Eine mögliche Ereignisrate würde dadurch weniger als 7 % betragen.

4.1.5 Untersuchungen zur Virusverteilung in einem Apfelunterlagenquartier

Die Untersuchung einer ersten repräsentativ entnommenen Stichprobe (ca. alle 5 m je Reihe) von insgesamt 248 Pflanzenproben verschiedener Unterlagentypen am 2.9.13 im Unterlagenquartier einer Baumschule ergab insgesamt sieben Pflanzen mit Virusnachweis, was einer Infektionsrate von 2,8 % entspricht. ACLSV, ASPV und ASGV

wurden einzeln oder als Mischinfektion nachgewiesen, die überwiegend beim Unterlagentyp M 11 auftraten (Tab.8). ApMV wurde nicht gefunden. Insgesamt war die Infektionsrate gering. Die nachfolgende Untersuchung von insgesamt 79 Pflanzen am 14.10.13, die sich im Umkreis von ca. 0,7 – 1,2 m von diesen viruspositiven Pflanzen befanden, zeigte insgesamt 6 Positivbefunde, was demgegenüber einer erhöhten Infektionsrate von 7,6 % entspricht (alle Viren zusammen genommen). Eine statistische Auswertung dieser unterschiedlichen Infektionshäufigkeiten mit dem Exaktentest nach Fisher ergab einen Signifikanzwert von $p = 0,091$, was bei einem Signifikanzniveau von 95 % nicht mehr signifikant ist, bei einem Niveau von 90 % aber noch eine Signifikanz ergeben würde. Mit dem Chi-Quadratstest ergab sich ein Wert für $p = 0,059$, der die 95% Signifikanzschwelle nur knapp verfehlt.

Tab. 8: Anzahl viruspositiver Pflanzen bei verschiedenen Unterlagentypen (repräsentative Stichprobe) und deren benachbarten Pflanzen in ca. 1 m Umkreis in einem sechs Jahre alten Unterlagenquartier

Unterlagen- typ	Anzahl untersuchter Pflanzen	davon viruspositiv	Anzahl untersuchter benachbarter Pflanzen	davon viruspositiv
M 9	156	1 x ASPV	11	0
M 11	48	3 x ASPV 1 x ACLSV 1 x ACLSV/ASPV	35 10 12	1 x ASPV/ASGV 1 x ACLSV 1 x ASPV/ASGV
M 26	20	0	0	0
MM 111	24	1 x ACLSV	11	3 x ACLSV
Gesamt	248	7 (2,8 %)	79	6 (7,6 %)

4.2 Nachweismöglichkeit von Apfelviren im Jahresverlauf

Die Untersuchungen zu den erzielbaren Verdünnungsgrenzen für die Viren erstreckten sich über einen Zeitraum von insgesamt 17 Monaten, so dass sich ein voller Jahreszyklus und ein zusätzlicher Überschneidungszeitraum von fünf Monaten mit Ausnahme für den Monat Dezember 2014 ergab, in welchem aus dem Reiserschnittgarten keine Proben zur Verfügung standen. Die Ergebnisse für die einzelnen Viren sind in den Abb. 10a-d dargestellt.

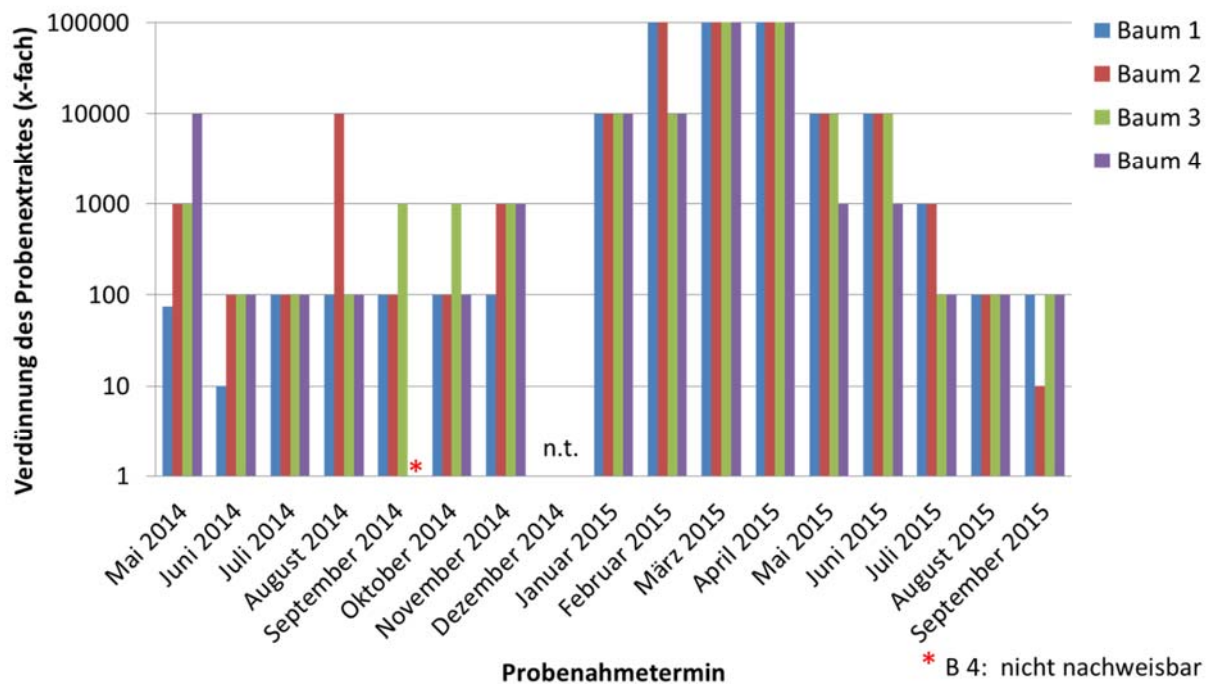


Abb. 10a: Jahreszeitlicher Verlauf der Verdünnungsgrenzen für ApMV in künstlich infizierten Reiserschnittbäumen der Sorte ‚Bittenfelder‘, n.t. = nicht getestet

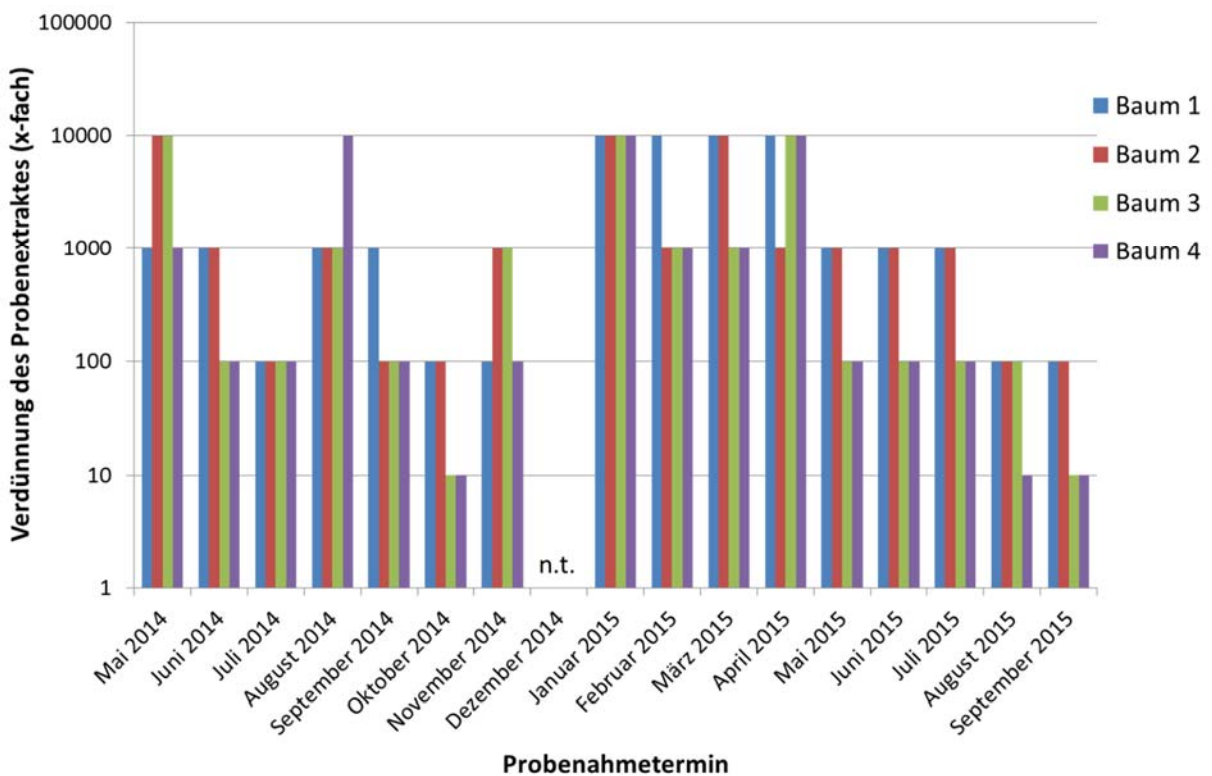


Abb. 10b: Jahreszeitlicher Verlauf der Verdünnungsgrenzen für ACLSV in natürlich infizierten Reiserschnittbäumen der Sorte ‚Stina Lohmann‘, n.t. = nicht getestet

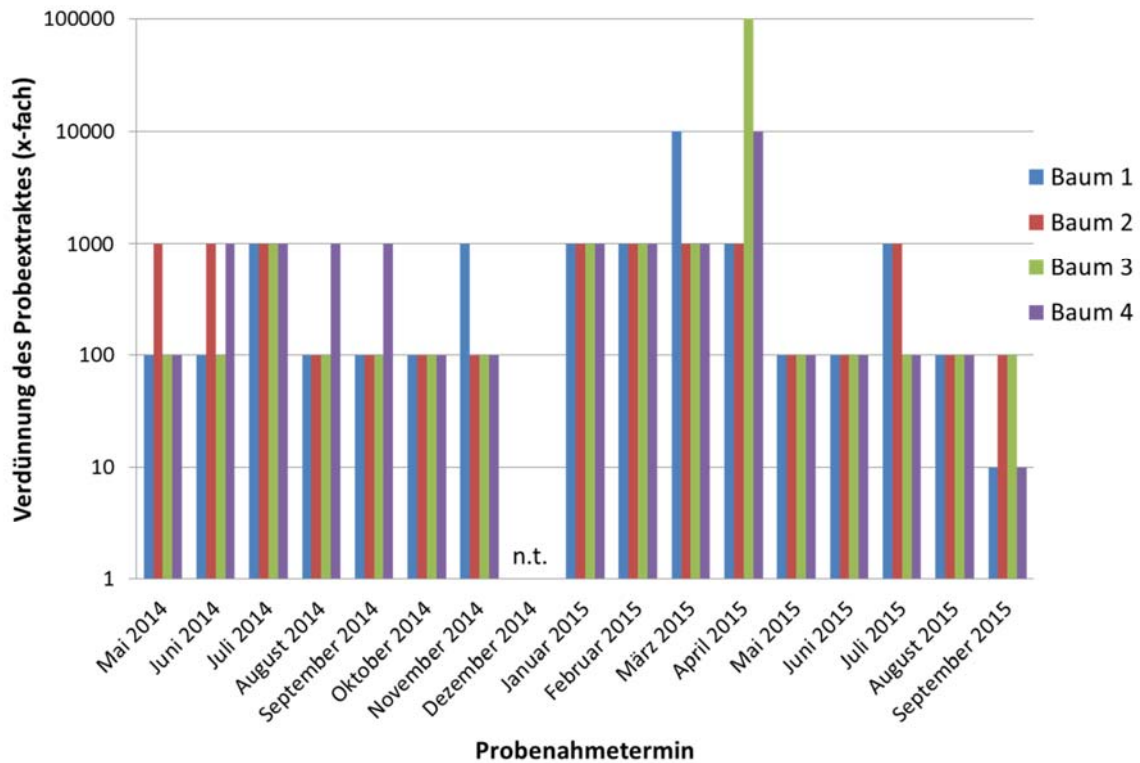


Abb. 10c: Jahreszeitlicher Verlauf der Verdünnungsgrenzen für ASPV in natürlich infizierten Reiserschnittbäumen der Sorte ‚Roter v. Simonffi‘, n.t. = nicht getestet

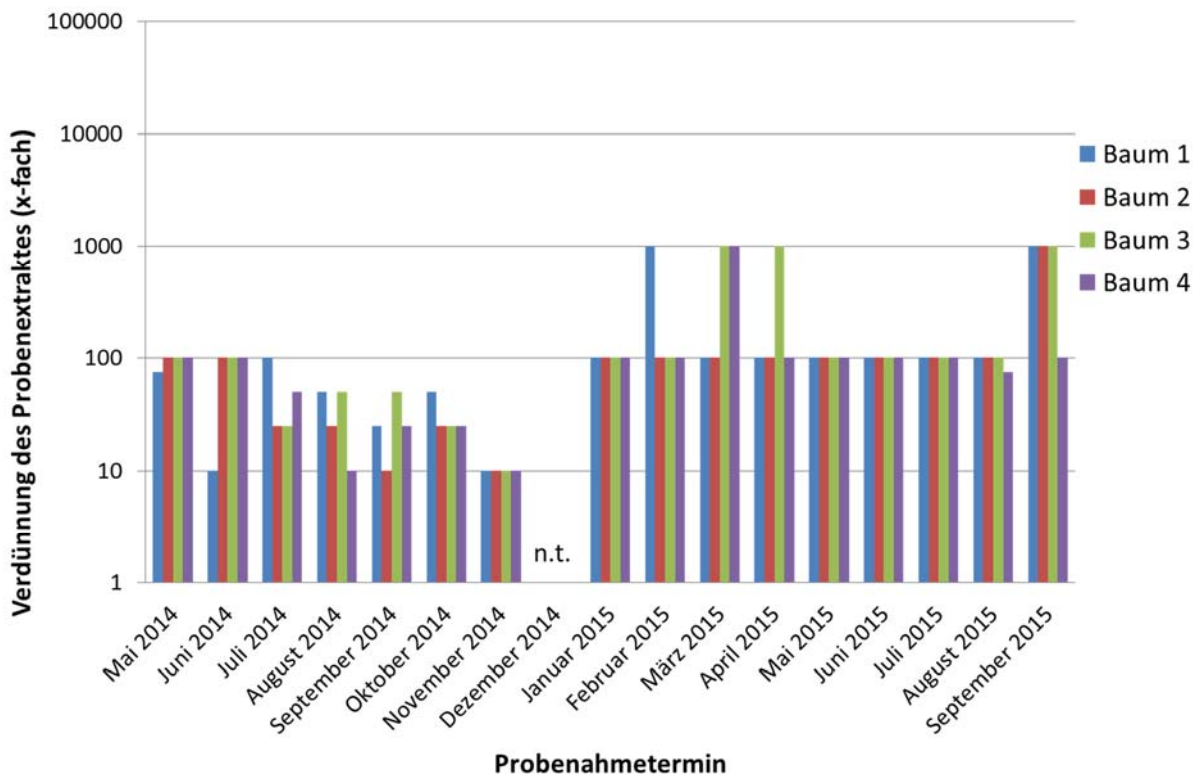


Abb. 10d: Jahreszeitlicher Verlauf der Verdünnungsgrenzen für ASGV in natürlich infizierten Reiserschnittbäumen der Sorte ‚Idared‘, n.t. = nicht getestet

Alle vier Viren sind im Jahresverlauf bei den hier untersuchten Sorten jederzeit mindestens auf der niedrigsten Verdünnungsstufe von 1:10 mit der PCR nachweisbar;

obwohl für den Dezember keine Proben vorlagen, kann dies aufgrund des Gesamtverlaufs auch für diesen Monat angenommen werden.

Die höchsten erreichten Verdünnungen im Jahresverlauf lagen bei allen Viren hauptsächlich in den Monaten Januar bis April; möglicherweise kann auch der Monat Dezember (keine Untersuchungen) noch dazugerechnet werden. Bei den maximal erreichten Verdünnungsstufen gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Viren. Am höchsten waren die Werte für ApMV, dann folgten in abnehmender Reihenfolge ACLSV, ASPV und ASGV.

Zwischen den einzelnen Wiederholungen (4 Bäume) gab es bei allen Viren teils größere Unterschiede bei den erreichten Werten, die öfters bis zu einer Zehnerpotenz, vereinzelt auch bis zu zwei Zehnerpotenzen auseinander lagen. In denjenigen Monaten, für die Messwerte aus zwei Jahren vorlagen (Mai bis September 2014 und 2015), zeigten sich für die einzelnen Viren teils unterschiedliche Einflüsse des Untersuchungsjahres. Während beim ACLSV und ASPV überwiegend ähnliche Verdünnungsendstufen in beiden Jahren erreicht wurden, ergaben sich beim ApMV in den Monaten Mai bis Juli 2015 zumeist um ein bis zwei Zehnerpotenzen höhere Verdünnungsgrenzen als in den gleichen Monaten des Vorjahres. Beim ASGV bewegten sich die Unterschiede auf einem deutlich niedrigeren Niveau, wobei im Jahr 2015 mit einer Ausnahme immer eine Verdünnungsgrenze bis 1:100 erreicht wurde, während dies im Jahr 2014 häufiger nicht der Fall war.

4.3 Optimierung des Nachweises von Birnenverfall im jahreszeitlichen Verlauf

In diesem Versuch wurden verschiedene Fragestellungen kombiniert:

1. Vergleich von zwei Extraktionsverfahren (Silicagel-Verfahren versus DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen))
2. Vergleich von drei Nachweisverfahren (qualitative nested PCR, Rt-LAMP, realtime PCR) in der Detektionsrate
3. Auswirkung zwischen einer Verwendung von drei oder fünf Triebstückproben je Baum auf die Nachweisrate

Die Einzelversuchsergebnisse sind in Tab. 9a und 9b dargestellt. Da mit Birnenverfall-unspezifischen Primerpaaren in der nested PCR detektiert wurde, wurden etwa die Hälfte aller Amplifikate noch einer Sequenzierung unterzogen, um die Identität von *Candidatus phytoplasma pyri* nachzuweisen. Der Abgleich der Sequenzierungsergebnisse mit der NCBI-Datenbank ergab Übereinstimmungen im Bereich von 95,8 bis 100 %.

Die Unterschiede sowohl zwischen den Nachweisverfahren als auch zwischen der verwendeten Anzahl Triebe pro Baum traten besonders bei denjenigen Sorten-/Unterlagenkombinationen hervor, wo die Detektionsraten insgesamt deutlich geringer ausfielen (,Xenia/Quitte A' und ,Conference/Sydo'). Auffällige Unterschiede ergaben sich auch im Jahresvergleich der Monate Januar bis Mai, für die Daten aus zwei Jahren (2014/15) vorlagen. Während bei ,48-40-95/Pyrodwarf' der Nachweis mit zumindest einem der Nachweis- bzw. Probenahmeverfahren an den Untersuchungsterminen meistens immer gelang, war dies bei den anderen zwei

Tab. 9a: Detektionsnachweise für PD mit unterschiedlichen Extraktions- und Nachweisverfahren sowie unterschiedlicher Probenzahlen im Jahresverlauf bei verschiedenen Unterlagen/Edelsorten-kombinationen. S3 /S2 und Q3/Q2 = Silica- bzw. Qiagenkit-Extraktion von 3 und 2 (zusätzlichen) Triebproben (jeweils als Mischprobe) des Baumes. - = kein Nachweis, + = Nachweis, n.t. = nicht getestet, nPCR = nested PCR, RtLP = Realtime-LAMP-Verfahren, RtPCR = realtime PCR, ¹vermutlich, *W = je eine Wurzelprobe am 4.11.14 entnommen und untersucht, ** je Baum 10 Triebproben statt üblicherweise 5 verwendet

Datum		20. 1. 2014		24. 2. 2014		26. 3. 2014		30. 4. 2014		20. 5. 2014	
Baum-Nr.	Nachweisverfahren/ Triebstücke	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP
1 Xenia/ Quitte A	S 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / +	- / -	- / -	n.t.	n.t.	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.	n.t.	- / -	n.t.
2 Xenia/ Quitte A	S 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / +	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.
3 Xenia/ Quitte A	S 3 / 2	- / -	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.
4 Confer- ence/Sydo	S 3 / 2	- / +	- / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.
5 Confer- ence/Sydo	S 3 / 2	+ / -	+ / -	+ / +	+ / +	- / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
	Q 3 / 2	+ / -	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.
6 Confer- ence/Sydo	S 3 / 2	- / -	- / -	- / +	- / +	+ / +	+ / +	- / +	- / +	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / +	- / +	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -	n.t.
7 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S 3 / 2	- / +	- / +	- / +	+ / +	- / +	- / +	+ / +	+ / +	- / +	- / +
	Q 3 / 2	- / +	- / +	- / +	- / -	+ / +	- / -	- / +	- / -	- / -	n.t.
8 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S 3 / 2	- / -	- / -	- / +	- / +	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	- / +	- / -
	Q 3 / 2	- / -	- / -	- / +	- / -	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -	n.t.
9 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S 3 / 2	- / -	- / -	+ / +	+ / +	- / +	- / +	+ / +	+ / -	- / -	- / -
	Q 3 / 2	- / +	- / -	- / -	- / -	- / +	- / -	- / -	- / -	- / -	n.t.

Fortsetzung Tab. 9a

Datum	Nachweis- verfahren/ Triebstücke	14.7.2014		19. 8. 2014		22.9.2014		14.10.2014		24.11.2014	
		nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP	nPCR	RtLP
1 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	- / -	- / +	- / -	- / -	+ / +	- / +	- / -	+ / +	+ / +	+ / +
2 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	- / -	- / -	- / +	- / -	- / -	- / -	- / - **	- / - **	n.t. *W -	n.t. *W -
3 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / - **	- / - **	n.t. *W -	n.t. *W -
4 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / - **	- / - **	n.t. *W -	n.t. *W -
5 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / +	- / - *W -	+ / - *W -
6 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / - **	- / - **	n.t. *W -	n.t. *W -
7 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
8 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
9 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	- / +	- / +	+ / +	+ / -	+ / -	+ / +	- / +	+ / +	+ / +	+ / +

Tab. 9b: Detektionsnachweise für PD im Vergleich verschiedener Nachweisverfahren sowie unterschiedlicher Triebprobenzahlen im Jahresverlauf bei verschiedenen Unterlagen/Edelsorten-kombinationen. S3 /S2 = Silicagel-Extraktion von 3 und 2 (zusätzlichen) Triebproben (jeweils als Mischprobe) des Baumes. - = kein Nachweis, + = Nachweis, nPCR = nested PCR, RtLP = Realtime-LAMP, RtPCR = realtime PCR, ¹vermutlich

Datum		8.1.2015			20.2.2015			18.3.2015			28.4.2015			15.5.2015		
Baum-Nr.	Nachweis- verfahren/ Triebstücke	nPCR	RtLP	RtPCR	nPCR	RtLP	RtPCR	nPCR	RtLP	RtPCR	nPCR	RtLP	RtPCR	nPCR	RtLP	RtPCR
1 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	+ / -	+ / +	+ / +	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	+ / -	+ / +	+ / -	- / -	+ / -	- / +	- / -	+ / +
2 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
3 Xenia/ Quitte A	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	+ / -	+ / +	- / -	- / -	- / -
4 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / +	- / +	- / +	- / +
5 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	+ / +	- / -	- / -	+ / -	+ / -	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / -	- / +	- / -	- / +
6 Confer- ence/Sydo	S3 / S2	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / +
7 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
8 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
9 48-40-95/ Pyrodwarf ¹	S3 / S2	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / +	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	+ / +

Sorten-/Unterlagenkombinationen deutlich weniger der Fall bzw. blieben die Nachweise ganz aus (Tab. 9a/b). Selbst eine Verdoppelung der Probenahmemenge auf 10 Triebstücke je Baum im Oktober 2014 an insgesamt vier Bäumen, die zuvor über mehrere Monate negative Testergebnisse zeigten, blieben ohne Befund, ebenso wie Wurzeluntersuchungen im folgenden Monat. Insgesamt betrachtet konnten, unabhängig von der Untersuchungsmethodik, Bäume häufiger in den Wintermonaten als in den Sommermonaten als PD-positiv detektiert werden.

Der Jahreseinfluss auf die Nachweisrate machte sich bei den Sorten-/Unterlagenkombinationen auch konträr bemerkbar. Während bei ‚Conference/Sydo‘ im Januar 2014 insgesamt deutlich häufiger Nachweise als im gleichen Zeitraum 2015 erzielt wurden, war dies bei ‚48-40-95/Pyrodwarf‘ umgekehrt. Auch bei den einzelnen Wiederholungen innerhalb einer Sorten-/Unterlagengruppe gab es Unterschiede in der Nachweishäufigkeit, die besonders bei ‚Xenia/Quitte A‘ und ‚Conference/Sydo‘ hervortraten.

4.3.1 Vergleich zwischen Silicagel-Extraktionsmethode und Fertigkeit

Die Extraktion mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ergab an den ersten fünf Probenahmeterminen bei insgesamt 79 vergleichenden Untersuchungen, unabhängig vom Nachweisverfahren (nested-PCR oder Rt-LAMP), nur 16 mal einen Nachweis von PD. Demgegenüber konnte mit dem Silicagel-Verfahren in 63 Fällen ein Nachweis erzielt werden (Tab. 9a). Aufgrund dieses deutlichen Unterschiedes wurde die Extraktion mit dem Plant Mini Kit im 5. Untersuchungsmonat eingestellt und nur noch mit dem Silicagel-Verfahren weitergearbeitet.

4.3.2 Vergleich der Nachweismethoden

Dieser Vergleich umfasste für die nested PCR versus Rt-LAMP insgesamt 260 Analysen (130 Probenahmen mit je einer Analyse für 3 bzw. 2 Triebstücke) für den Zeitraum Januar 2014 bis Mai 2015. Die Rt-PCR-Untersuchungen wurden an eingefrorenen Nukleinsäureextrakten, die bereits für die nested PCR und die Rt-LAMP verwendet worden waren, nachträglich nach Abschluss des Versuches für den Zeitraum Januar bis Mai 2015 durchgeführt (90 Analysen aus 45 Probenahmen). Für die Auswertung wurden nur die Ergebnisse mit der Silicagel-Extraktion herangezogen. Die höchste Nachweisrate von 55,6 % wurde mit der Rt-PCR erzielt, danach folgte die Rt-LAMP mit 43,1 und die nested PCR mit 38,5 % (Tab. 10), wobei die Vergleichsdaten für die Rt-PCR jedoch auf einer deutlich geringeren Analysenzahl beruhen (vgl. Tab. 9b).

Das zunächst zu Versuchsbeginn verwendete Blue LAMP-Verfahren nach Neumüller et.al. (2014) führte zu widersprüchlichen bzw. nicht reproduzierbaren Ergebnissen (nicht dargestellt). Als Ursache wurde zusammen mit dem Hersteller ein offensichtlich mittelfristig instabiler Bestandteil des Mastermixes ermittelt. Die Blue LAMP wurde deshalb durch das Rt-LAMP-Verfahren nach Nußbaum (2013) ersetzt.

Tab. 10: Detektionsraten von Birnenverfall im Vergleich der Nachweismethoden nested-PCR, Rt-LAMP und Rt-PCR an Silicagel-Nukleinsäureextrakten ¹⁾ jeweils zur Hälfte aus Mischproben unter Verwendung von drei bzw. zwei Triebstücken bestehend

	Anzahl Analysen insgesamt ¹⁾	davon Anzahl positiver Nachweise	positive Nachweise in %
Nested PCR	260	100	38,5
Rt-LAMP	260	112	43,1
Rt-PCR	90	50	55,6

4.3.3 Vergleich der Anzahl untersuchter Triebstückproben je Baum

Die Verwendung von insgesamt fünf gegenüber drei Triebstückproben je Baum führte in der Summe aller Untersuchungen zu einer erhöhten Detektionsrate an PD-infizierten Bäumen (Tab. 11), wenn auch in unterschiedlicher Höhe für die einzelnen Nachweisverfahren. Die Zunahme reichte von 15,4 bis 39,1 % für die Rt-PCR bzw. nested PCR, die Rt-LAMP lag mit 27,8 % dazwischen. Im Mittel aller drei Nachweisverfahren konnte dadurch die Detektionsrate um 27,4 % erhöht werden.

Bei den Nachweisverfahren zeigte auch hierbei die Rt-PCR die insgesamt höchsten Detektionsraten (57,8 % bei drei Triebproben bzw. 66,7 % bei insgesamt fünf Triebproben), die nested PCR lag mit 35,4% bzw. 49,2 % deutlich darunter, wobei allerdings für die Rt-PCR eine wesentlich geringere Vergleichsbasis (Anzahl Baumproben) vorlag (vgl. Tab. 9b). Die Detektionsraten für die Rt-LAMP lagen mit 41,5 zw. 53,1 % näher an der nested als an der Rt-PCR. Unabhängig davon gab es jedoch auch Fälle, in denen an einzelnen Terminen und Bäumen entweder nur mit der einen oder anderen Methode Positivnachweise erzielt werden konnten.

Tab. 11: Vergleich der Anzahl PD-positiv detektierter Bäume bei Verwendung einer Mischprobe von drei Triebstücken bzw. einer zusätzlichen zweiten Mischprobe mit zwei Triebstücken je Baum (Silicagel-Nukleinsäureextrakte) mit der nested-PCR, der Rt-LAMP und der Rt-PCR

	Anzahl Baumproben gesamt	Anzahl positiv detektierter Bäume mit 3 Triebstückproben/ Baum (% in Klammern)	Anzahl positiv detektierter Bäume mit 3 und 2 Triebstückproben/Baum zusammen (% in Klammern)	zusätzliche positiv detektierte Bäume bei Verwendung von 5 gegenüber 3 Triebstückproben/Baum (%)
Nested PCR	130	46 (35,4)	64 (49,2)	39,1
Rt-LAMP	130	54 (41,5)	69 (53,1)	27,8
Rt-PCR	45	26 (57,8)	30 (66,7)	15,4

4.4 Überprüfung von Pflanzmaterial hinsichtlich möglicher Viren- und Phytoplasmen-Eintragungen in einen Reiserschnittgarten

Im Zeitraum Oktober 2014 bis März 2015 wurden insgesamt 183 Apfel-, Birnen- und Quittenbäume als Stichprobe auf Befall mit Kernobstphytoplasmen bzw. Apfelviren aus Lieferungen untersucht, die in einem Reiserschnittgarten zur Aufpflanzung kamen. Die Partien hatten zusammen einen Umfang von mehr als 965 Bäumen, so dass die Stichprobengröße ca. 20 % umfasste. Eine Zusammenstellung zeigt Tab.12. In keinem Fall wurden Phytoplasmen bzw. Viren nachgewiesen.

Tab. 12: Auf Phytoplasmen und Viren untersuchte Stichproben von Kernobstpflanzmaterial
P = Phytoplasmen, V= Viren ACLSV, ApMV, ASGV, ASPV, n.b. = nicht bekannt,
vf = Zertifizierungskategorie ‚virusfrei‘

Monat/ Jahr	Stich- proben- größe	Gesamtzahl der Partie	Obstart	unter- suchter Pflanzenteil	unter- sucht auf	Nachweis- verfahren	Test- ergebnis
10/2014	15	n.b.	Apfel, vf	Triebe	P	PCR	negativ
1/2015	72	360	Quitte, vf	Wurzel	P	PCR, LAMP	negativ
3/2015	48	340	Apfel, vf	Wurzel	P	PCR, LAMP	negativ
				Triebe	V	PCR	negativ
3/2015	48	250	Birne, vf	Wurzel	P	PCR, LAMP	negativ
Gesamt	183	>965					negativ

5. Diskussion der Ergebnisse

Bei den Versuchen zur Bodenübertragung ließen sich in den Topfversuchen drei von fünf erstmaligen Virusnachweisen an den folgenden Probenahmeterminen nicht mehr reproduzieren. Durch eine spätere Überprüfung der RNA-Extrakte mit erneuter Amplifikation und Sequenzierung ließen sich falsch positive Ergebnisse ausschließen, so dass von definitiven Virusnachweisen ausgegangen werden kann. Die ausbleibenden Nachweise bei den späteren Probenahmen sind deshalb überraschend, da dauerhafte bzw. etablierte Infektionen mit nachweisbaren Virustitern erwartet wurden. Instabile Wirt-Pathogenbeziehungen sind für diese Viren bisher nicht bekannt. Hinweise auf eine stärkere Ungleichverteilung der Viren in den Pflanzen als mögliche Erklärung, wie sie z.B. vom Scharkavirus bei Steinobst bekannt ist, liegen bislang ebenfalls nicht vor. Diese wären nur im Anfangsstadium einer Infektion während der Ausbreitungsphase in der Pflanze zu erwarten. Allerdings war bei der letzten Testung im August 2016 beim ASPV auffällig, dass beim diesmal erhöhten Probenahmeumfang (vier Mischproben zu je 5 Blätter pro Baum) an beiden Nachbarbäumen nur jeweils ein Teil dieser Proben viruspositiv war, was auf Virustiter an der Nachweisgrenze oder eine Ungleichverteilung hindeuten könnte. Zudem gelangen für dieses Virus an zwei zwischenzeitlichen Probenahmeterminen (Oktober 2015, April 2016) keine Nachweise. Demgegenüber ergaben sich für alle Viren im „Virustestkalender“ aber keine Hinweise auf eine temporäre Nichtnachweisbarkeit mit der PCR im Jahresverlauf (vgl. Kap. 4.2). Kontaminationen oder fehlerhafte Probenahmen sind zwar nicht gänzlich auszuschließen, konkrete Anhaltspunkte dafür lagen jedoch nicht vor. Insofern können

nur insgesamt zwei Virusübertragungen für das ACLSV bzw. ASPV im Versuch ohne Wurzelsperre als etabliert betrachtet werden, die sich erstmals nach ca. zwei Jahren Standdauer nachweisen ließen. Dieses würde für das ACLSV und ASPV eine Ereignisrate von jeweils 17 % (je eine von sechs Wiederholungen) bedeuten; für die anderen Viren lässt sich dagegen aus den Topfversuchen keine gesicherte Rate ableiten. Nicht mit übertragen wurden dabei das ApMV bzw. ASGV, welche sich jeweils als weitere Viren in den künstlich infizierten Pflanzen befanden. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Lešnik et al. (2008) fanden in ihren ähnlich aufgebauten Topfversuchen zu Wurzelübertragungen bei der Apfelunterlage M 9, allerdings für die Apfeltriebsucht, nach vier Jahren Versuchsdauer eine Übertragung in 24 % der Gefäße, sichtbare Wurzelverwachsungen aber nur bei 8 %.

Im Topfversuch mit Wurzelsperre ließ sich der einmalige Virusnachweis für ACLSV in der Folgezeit ebenfalls nicht wiederholen. Falls aber tatsächlich eine Virusübertragung durch direkte Wurzelkontakte stattgefunden haben sollte, hätte diese nur im Feinstwurzelbereich unterhalb von ca. 200-300 µm Wurzeldurchmesser passieren können, da die Netze Kontakte zwischen größeren Wurzeldurchmessern verhindert haben.

Nematoden gelten bislang nicht als Vektoren für Apfelviren. Die von Fritsche und Kegler (1968) in Gewächshausversuchen beobachtete Übertragung von ACLSV durch eine nicht näher bestimmte Art aus der Gattung *Eudorylaimus* wurde seitdem nicht wieder bestätigt. In den eigenen Versuchen können freilebende Nematoden als mögliche Überträger nahezu ausgeschlossen werden, da diese im Boden derjenigen Pflanzen, bei denen Virusübertragungen festgestellt wurden, am Ende des Versuchszeitraums nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Ereignisraten von 17 % für das ACLSV bzw. ASPV im Topfversuch ohne Wurzelsperre lassen das Potential für Virusübertragungen im Boden im Versuchszeitraum erkennen. Dieses kann jedoch nicht auf die Verhältnisse in einem Reiser Muttergarten übertragen werden. Die Wurzelwerke der Bäume im Topf sind durch das sehr beengte Platzangebot gezwungen, sehr stark ineinander zu wachsen, wodurch sich rein statistisch mehr Möglichkeiten zu Wurzelkontakten bzw. -verwachsungen ergeben, als dies unter praxisüblichen Verhältnissen zu erwarten ist. Zudem war die Anzahl der Wiederholungen als Datenbasis relativ gering. Der Vergleich zum Aufpflanzversuch, in welchem die Bäume innerhalb der Reihe mit einem in Reiserschnittgärten praxisüblichen Pflanzabstand von 0,6 m standen, zeigt demgegenüber auch, dass innerhalb einer Standzeit von drei Jahren kein reproduzierbarer Nachweis für eine Virusübertragung bei 10 Wiederholungen mit einem künstlich infizierten und je zwei virusfrei gepflanzten Nachbarbäumen gelang. Die daraus ermittelte Ereignisrate von <10 % für alle Viren ist im Hinblick auf mögliche Virusübertragungen aber wahrscheinlich noch geringer anzusetzen, da jede Wiederholung zwei virusfrei gepflanzte Nachbarbäume enthielt, also insgesamt 20, bei denen sich am Versuchende keine Virusinfektionen nachweisen ließen. Da die Wurzelwerke bereits nach ca. einem Jahr nach der Pflanzung erste Kontakte gehabt haben dürften, hätten im Versuchszeitraum ca. zwei Jahre für Wurzelkontakte und mögliche Virusübertragungen zur Verfügung gestanden.

Frühere Messungen über die Wurzel ausbreitung bis in den Feinwurzelbereich bei veredelten Apfelsämlingen in zwei Baumschulen ergaben ca. 18 Monate nach der

Pflanzung Radien zwischen von ca. 0,6 und 0,9 m in einem schluffigen Lehmboden bzw. ca. 1- 1,5 m nach drei und vier Jahren Standzeit in einem sandigen Lehmboden (Schröder, unveröffentlicht), so dass im Versuchszeitraum auch Wurzelkontakte bis zum übernächsten Baum innerhalb der Reihe möglich gewesen wären. Dieser Ausbreitungsradius hätte auch Wurzelkontakte bis zur parallel nachgepflanzten Reihe mit virusfreien ‚Bittenfelder‘ in 1,35 m Entfernung innerhalb der Standzeit von 25 Monaten ermöglicht, was aber nicht zu nachweisbaren Virusübertragungen führte. Die Hangneigung von ca. 5 % zwischen den Reihen hätte auch zumindest theoretisch eine eventuelle Virusübertragung über eine gerichtete Bewegung mit der Bodenlösung ermöglicht; allerdings ergaben sich bereits aus den Gefäßversuchen keine Virusnachweise in den Bodeneluat.

Die Voraussetzungen für Virusübertragungen durch Wurzelverwachsungen zwischen den Reihen, die in Reiserschnittgärten meist einen Abstand von etwa drei Metern aufweisen, dürften dann frühestens nach mehreren Jahren Standzeit gegeben sein. Dass das Risiko für Übertragungen zwischen den Reihen noch einmal deutlich geringer einzuschätzen ist als Übertragungen innerhalb einer Reihe, ließen auch Wurzeluntersuchungen von Henkel (2012) in Mutterbeeten der Apfelunterlage MM 106 erkennen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Hauptwurzeln i.d.R. parallel zur Reihe und in den Unterboden entwickelten, was vorrangig eine Folge von Bodenverdichtungen innerhalb der Fahrgassen sein dürfte.

Die höhere Befallsrate im Umkreis virusinfizierter Unterlagen als im Gesamtbestand eines sechs Jahre alten Apfelunterlagenquartiers war zwar statistisch nicht signifikant, die Nähe des Signifikanzwertes „p“ zu den Signifikanzschwellen in beiden verwendeten Prüfverfahren weist aber auf einen möglichen Effekt hin, der sich nur als Ergebnis einer Virusausbreitung erklären lassen würde. Der ursprüngliche Ausgangsbefall im Bestand, der aufgrund der fehlenden Vektorübertragbarkeit nur durch die Pflanzung virusinfizierter Pflanzen eingetreten sein kann, war in seiner Höhe leider nicht bekannt. Der deutlich engere Pflanzabstand (0,3 m in der Reihe, 0,75 m zwischen den Reihen) in den Unterlagenmutterbeeten als in Reiser Muttergärten begünstigt ein schnelleres und intensiveres Ineinanderwachsen der Wurzelwerke benachbarter Pflanzen. Für die hier vorgefundenen Unterlagen M9 und M11 wurden in früheren Untersuchungen nach 2 bzw 1½ Jahren Standzeit bereits Wurzelradien von 0,35 - 0,50 bzw. 0,60 - 0,95 m ermittelt (Schröder, unveröffentlicht), so dass mehrere Jahre für Wurzelkontakte zu Nachbarpflanzen in dem untersuchten Quartier zur Verfügung standen.

Für eine Virusübertragung durch Bodeneluate, die aus Gefäßen gewonnen wurden, in denen virusinfizierte Bäume wuchsen, auf virusfreie Bittenfelder Unterlagen konnte kein Nachweis erbracht werden. Auch in den Bodeneluat selbst ließen sich keine Viren nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Auswaschungsvorgang zu einer Verdünnung der Konzentration eventuell vorhandener freier Viruspartikel geführt hätte. Selbst wenn im Bodeneluat Virus-RNA durch die PCR detektiert worden wäre, würde dies noch nichts über die Infektiosität der Viruspartikel aussagen. Die Stabilität der Viruspartikel im Boden hängt von einer Reihe von Faktoren ab, die von Kegler et al. (1991) ausführlich diskutiert wurden. Dazu gehören vor allem die Adsorption an mineralische und organische Bestandteile, der pH-Wert, die Temperatur sowie die

biologische Aktivität im Boden. Auch wenn Viruspartikel von den Baumwurzeln nicht aktiv ausgeschieden werden sollten, müssten diese jedoch über absterbende Wurzeln in den Boden gelangen können. Möglicherweise verhindern die erwähnten Bodenfaktoren oder/und das gewählte Extraktionsverfahren in Verbindung mit sehr geringen Viruskonzentrationen im Bodeneluat eine Detektion. Für eine Nichtverfügbarkeit infektiöser Viruspartikel im Boden oder die Unfähigkeit der Unterlagenwurzeln, intakte Viruspartikel aufzunehmen, sprechen auch die Ergebnisse des Nachpflanzversuchs, in welchem innerhalb von zwei Jahren keine Virusinfektionen in Bäumen auftraten, die in einem Boden nachgepflanzt wurden, in welchem zuvor über mehrere Jahre viruskranke Bäume (ACLSV, ASGV und ASPV) gestanden hatten. Es liegen aus diesen Versuchen somit keine Anhaltspunkte für ein Infektionsrisiko durch ACLSV, ASGV und ASPV vor, die einer sofortigen Nachpflanzung von gesunden Bäumen in einem Boden, auf dem zuvor viruskranke Bäume standen, entgegenstünden. ApMV war aufgrund des fehlenden Vorkommens in dieser Untersuchung nicht enthalten, es liegen aber keine Hinweise auf möglicherweise abweichende Eigenschaften vor. Dass zu späteren Zeitpunkten noch Virusinfektionen eintreten könnten, erscheint unwahrscheinlich. Als eher instabile Viren wären diese mit der Zersetzung abgestorbener Wurzeln viruskranker Bäume einem schnellen mikrobiellen Abbau ausgesetzt.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zum Virusnachweis an Reiserschnittbäumen zeigen, kann ganzjährig mit dem gerade verfügbaren Probenmaterial (Blätter bzw. Rinde und/oder Knospen) eine Testung erfolgen. Diese Möglichkeit stellt aufgrund der deutlich höheren Sensitivität und den dadurch bedingten Vorteilen der PCR gegenüber dem serologischen ELISA-Test einen wesentlichen Fortschritt dar. Bei dem von Fuchs et al. (1988) erstellten ELISA-Testkalender für die wichtigsten Kern- und Steinobstviren war noch die unterschiedliche Nachweisfähigkeit der einzelnen Viren in nur bestimmten Geweben für begrenzte Zeiträume zu beachten. Obwohl auch bei Apfelviren eine gewisse Ungleichverteilung im Baum bzw. in verschiedenen Gewebearten nachgewiesen wurde (u.a. Grüntzig et al. 1994, Knapp et al. 1995, Kundu et al. 2003), ist die RT-PCR in Verbindung mit der Silicagel-Extraktion offensichtlich sensitiv genug, um die Viren in einer Mischprobe von einem Baum im Jahresverlauf jederzeit zu erfassen. Für das ASPV konnte dies bereits von Arntjen und Jelkmann (2010) an vier Apfelsorten gezeigt werden. Kundu et al. (2003) konnten dies beim ASGV für den Zeitraum Januar bis August nachweisen, wobei sich unterschiedliche Nachweisraten bei verschiedenen Apfelsorten ergaben. Hilber-Bodmer et al. (2003) gelang dagegen kein Nachweis für das ACLSV mit einer RT-PCR an verschiedenen Apfelsorten in den Monaten Mai und Juli, aber im April und November. Wie aus den eigenen Untersuchungen hervorgeht, wies das ASGV im Vergleich aller Viren insgesamt die niedrigsten Verdünnungsgrenzen und somit niedrigsten Virustiter auf, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass u.a. sortenbedingte Abweichungen (höhere oder niedrigere Werte) gegenüber der hier untersuchten Sorte ‚Idared‘ auftreten können. Dies gilt auch für die anderen untersuchten Viren. Weiterhin kann der Virustiter zwischen verschiedenen Jahren differieren, wie die Ergebnisse für die Monate Mai bis September aus 2014 und 2015 erkennen lassen. Sehr niedrige Titer für ASGV fanden auch Knapp et al. (1995) bei ihren ELISA-Untersuchungen an in-vitro Kulturen verschiedener Apfelsorten.

Demgegenüber wurde vom ApMV mit 1:100.000 mehrfach die höchste Verdünnungsstufe erreicht, wobei möglicherweise auch noch höhere Werte erreichbar gewesen wären, was hier aber nicht untersucht wurde. Der besonders beim ApMV ausgeprägte Rückgang des Virustiters in den Sommermonaten, wie er auch von Svoboda und Polak (2010) an zwei Apfelsorten beobachtet wurde, ist nach Vermutung dieser Autoren möglicherweise auf eine Thermolabilität des Virus zurückzuführen. Die von Menzel et al. (2002) ermittelten Verdünnungsgrenzen für ACLSV, ASGV und ASPV bei Rindenproben, die im Sommer genommen worden waren, lagen jeweils bei 1:40, für ApMV bei 1:100. Dies stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen an Blattproben für ApMV überein, für die übrigen Viren konnten aber für diesen Zeitraum bis auf das ASGV zumeist ebenfalls Verdünnungen von 1:100 erzielt werden.

Für Mischproben zur Testung größerer Baumzahlen wäre der Zeitraum Januar bis April zu bevorzugen, da in den übrigen Monaten bei allen Viren vereinzelt bis wiederholt Verdünnungsgrenzen von nur 1:10 erreicht wurden. Dies trifft insbesondere für das ASGV aufgrund seiner insgesamt niedrigen Virustiter zu. Da eine übliche Standardverdünnung für eine Gesamt-RNA-Extraktion einer Probe bereits 1:10 beträgt, könnte im Falle einer Mischprobe von mehreren Bäumen durch virusnegative Bäume ein Verdünnungseffekt eintreten, der die Detektion eines einzelnen viruskranken Baumes nicht mehr sicher erlaubt. In den Monaten Januar bis April erscheinen Mischproben von bis zu etwa 10 Bäumen, wie sie aus Gründen der praktischen Handhabung wahrscheinlich nicht überschritten werden würden, mit einem ausreichenden Sicherheitspuffer realisierbar. Dieser sollte auch eingeplant werden, um die möglichen Schwankungen der Virustiter zwischen einzelnen Bäumen einer Sorte, unterschiedlichen Jahreseinflüssen und sortenbedingten Unterschieden zu berücksichtigen. Gegebenenfalls sollten in Voruntersuchungen für die Testung eines Bestandes Verdünnungsgrenzen ermittelt und daraus der mögliche Umfang von Mischproben abgeleitet werden. Ungeachtet dessen bietet sich der genannte Zeitraum auch deshalb für Untersuchungen an, da er zur Entlastung von Arbeitsspitzen im Labor beitragen kann, die i.d.R. in den Sommermonaten auftreten.

Die Untersuchungen zum Birnenverfall ließen einen wesentlichen Einfluss der Sorten-/Unterlagenkombinationen auf die Detektionsfähigkeit erkennen. Unterschiedliche Anfälligkeiten für den Birnenverfall könnten dafür eine Erklärung sein. Seemüller et al. (1986) fanden im Vergleich der Unterlagen ‚Quitte A‘ und ‚Kirchensaller Mostbirne‘ bei der Sorte ‚Gellerts‘ deutlich geringere Symptome auf erstgenannter Unterlage in Verbindung mit einer wesentlichen geringeren Besiedlungsstärke der Phytoplasmen. Bei der Apfeltriebsucht konnten ebenfalls geringere Phytoplasmentiter bei resistenten *Malus sieboldii*-Kreuzungen im Vergleich zu anfälligen M9-Unterlagen festgestellt werden (Jarusch et al. 2011). Allerdings kann wohl nicht generell zwischen einem Zusammenhang von Resistenz- bzw. Toleranzeigenschaften und dem Phytoplasmentiter ausgegangen werden, wie Gaudin et al. (2001) bei Lavendel zeigen konnten.

Darüber hinaus ist eine gleichbleibende Nachweissicherheit im Jahresverlauf in Triebproben aufgrund des saisonalen Besiedlungsverhaltens der Phytoplasmen, wie er von Seemüller et al. (1984a,b) nachgewiesen wurde, nicht zu erwarten. Dies zeigte sich auch in Untersuchungen von Errea et al. (2002) an drei Birnenbäumen für den Zeitraum November bis Juni, in welcher die Nachweishäufigkeit mit der nested PCR im Frühjahr

geringer als im Winter ausfiel; dabei wurde auch eine Ungleichverteilung für verschiedene Baumhöhen nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse zum Jahresverlauf erzielten auch Garcia-Chapa et al. (2003) mit der nested PCR an drei Birnensorten, bei denen sich die höchsten Nachweisraten für die Monate Dezember bis März/April unter spanischen Verhältnissen ergaben. Die Sorte mit der geringsten Nachweisrate galt dabei als toleranteste gegenüber dem Birnenverfall. In mehrjährigen Untersuchungen mit der nested PCR ermittelten auch Kučerová et al. (2007) die höchsten Nachweisraten an mehreren Birnensorten für denselben Zeitraum. Die eigenen Ergebnisse für die Sorten-/Unterlagenkombination ‚48-40-95/Pyrodwarf‘ zeigten zwar, dass auch in den Sommermonaten bei Verwendung von insgesamt fünf Triebstücken fast immer Nachweise möglich waren, dies bei den anderen beiden Unterlagen-/Sortenkombinationen aber nicht oder nur vereinzelt gelang. Insgesamt sollten deshalb, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der o.g. Autoren, die Wintermonate für eine Untersuchung auf den Birnenverfall gewählt werden.

Erschwerend für einen Nachweis wirken sich auch die Ungleichverteilung der Phytoplasmen im Baum sowie die offensichtlichen Unterschiede im Phytoplasmentiter selbst zwischen verschiedenen Bäumen derselben Sorte unter denselben Wachstumsbedingungen aus. Letzteres wurde besonders bei den Wiederholungen der Sorten/Unterlagenkombinationen ‚Xenia/Quitte A‘ und ‚Conference/Sydo‘ deutlich. Dass bei Phytoplasmen wohl generell große Unterschiede im Phytoplasmentiter zwischen einzelnen Individuen auftreten können, zeigten auch die Untersuchungen von Hren et al. (2007) an Reben sowie Christensen et al. (2004) bei *Euphorbia pulcherrima* und *Catharantus roseus*. Zur Ungleichverteilung in den Pflanzen konnte Schneider 2011 (pers. Mitteilung) an Birnenunterlagen zeigen, dass es erregerefreie Bereiche bis zu 20 cm Länge an der Sproßachse gab.

Beim Vergleich der Extraktionsmethoden Silicagel-Methode gegenüber dem DNeasy plant mini kit überraschte die deutlich geringere Nachweisrate bei letztgenanntem Verfahren. Dies lässt sich am wahrscheinlichsten durch die deutliche geringere Probenmenge erklären, die im Fertigkit maximal verarbeitet werden kann (100 mg gegenüber 300 mg oder mehr bei der Silicagelmethode). Durch die Ungleichverteilung des Phytoplasmas im Gewebe sinkt bei einer geringeren Probenmenge auch die Wahrscheinlichkeit, die Phytoplasmen zu erfassen. Unter diesen Voraussetzungen erscheint der Fertigkit für die Nukleinsäureextraktion beim Birnenverfall nicht geeignet. Parallelextraktionen mit z.B. 3 x 100 mg Gewebe und einer anschließenden Vereinigung der Teilextrakte könnten diesen Nachteil zwar theoretisch ausgleichen, würden aus Zeit- und Kostengründen aber keine praxisrelevante Alternative darstellen. Ob sich eventuell noch höhere Nachweisraten durch CTAB-basierte Extraktionsverfahren erzielen lassen würden, wurde hier nicht untersucht.

Die Unterschiede bei den Nachweisverfahren nested PCR, Rt-LAMP und Rt-PCR fallen, wenn auch auf einer vergleichsweise geringen Datenbasis, recht eindeutig zugunsten letzterer aus. Vergleiche mit der nested PCR liegen in der Literatur u.a. von Torres et al. (2005) zu Phytoplasmen aus der Apfeltriebsucht-Gruppe vor, zu denen auch der Birnenverfall zählt. Die genannten Autoren fanden in einem Sensitivitätsvergleich u.a. mit Proben von fünf Obstarten (davon eine Birnenprobe) allerdings keinen Unterschied.

Johnston et al. (2014) konnten dagegen bei insgesamt ca. 100 Proben an Apfel- und Aprikosenbäumen eine geringfügig höhere Detektionsrate von 4,3 % für die Rt-PCR feststellen. Auch Hren et al. (2007) fanden bei Phytoplasmen an Reben eine signifikant höhere Detektionsrate für das realtime Verfahren. Obwohl diese Ergebnisse an anderen Pflanzenarten nicht direkt mit den hier erzielten Resultaten für den Birnenverfall vergleichbar sind, sprechen auch weitere Gründe für die Rt-PCR, da gegenüber der nested PCR nur ein PCR-Lauf notwendig ist und eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zur Auswertung entfällt. Diese Vorteile bietet auch die Rt-LAMP, bleibt in den vorliegenden Versuchen jedoch eindeutig unter den Detektionsraten der Rt-PCR, wäre aber wiederum gegenüber der nested PCR vorzuziehen.

Einen ähnlich großen Effekt wie die Wahl des Nachweisverfahrens auf die Detektionsrate von PD hat über den gesamten Versuchszeitraum und alle Unterlagen/Sortenkombinationen betrachtet die Verwendung von insgesamt fünf statt nur drei Triebstücken je Baum, was insbesondere bei der nested PCR zum Tragen kam. Diese „Verdichtung“ bei der Probenahme dürfte zu einer verbesserten Kompensation der Auswirkung der ungleichen Erregerverteilung im Baum beim Nachweis führen. Deshalb könnte mit einer noch umfangreicheren Probenahme die Wahrscheinlichkeit des Nachweises weiter erhöht werden, was jedoch sehr aufwändig wäre. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen bereits Johnston et al. (2014) für den Nachweis bei Obstphytoplasmosen. Dass aber auch eine Verdoppelung des Probenumfangs von 5 auf 10 Triebabschnitte noch nicht zum Ziel führen muss, zeigten die Untersuchungen an vier Bäumen im Oktober 2014, die zuvor bereits mindestens einmal positiv getestet werden konnten. In der Praxis wird eine Erhöhung der Mischprobe auf mehr als ca. fünf Blatt- oder Triebproben je Baum bei Massentestungen durch die erforderliche Bereitstellung der entsprechenden Arbeitskapazität bei der Probenahme und im Labor auf Grenzen stoßen. Es wäre auch noch zu überprüfen, ob die Verarbeitung von fünf Triebstücken in einer Extraktion zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Aufteilung in zwei Mischproben (je drei bzw. zwei Triebstücke) führt.

In Kombination mit der Rt-PCR konnte bei der Verwendung von fünf Triebstücken je Baum im Vergleich zur nested PCR mit drei Triebstücken fast eine Verdoppelung und mit 67 % die insgesamt höchste Detektionsrate erzielt werden. Dieser Wert wird jedoch wesentlich durch die bei der Sorten-/Unterlagenkombinationen ‚48-40-95/Pyrodwarf‘ relativ hohen Nachweisraten geprägt, ist aber für eine zuverlässige Detektion PD-infizierter Bäume insgesamt noch nicht befriedigend. Die Problematik ist dabei wohl primär in einer starken und schwankenden Ungleichverteilung des Erregers im Baum als in der verwendeten Nachweismethode begründet.

Obwohl die Ergebnisse nicht an der in Reiser Muttergärten verbreiteten Standardunterlage ‚Kirchensaller Mostbirne‘ erzielt wurden, lassen diese dort keine grundsätzlich anderen Resultate erwarten.

Die stichprobenartige Überprüfung von insgesamt ca. 1000 Apfel- und Birnenbäumen auf Virus- und/oder Phytoplasmenbefall, die neu im Reiserschnittgarten zur Aufpflanzung kommen sollten oder gepflanzt waren, ergab erfreulicherweise keine Nachweise und damit keinen Anlass für weitere Rückverfolgungen. Dieses Ergebnis sollte aber kein Grund sein, solche Untersuchungen zu vernachlässigen, da es nicht repräsentativ

sein kann. Vor allem aufgrund des Quarantänestatus der Phytoplasmosen Apfeltriebsucht und Birnenverfall hat die Freiheit von diesen Schadorganismen eine große Bedeutung, auch für eine jederzeit sichere Versorgung der Baumschulwirtschaft mit Edelreisern oder Unterlagen sowie die wirtschaftliche Existenzsicherung eines Reiserschnittgartens. Stichprobenartige Nachtestungen bei neu aufzupflanzenden Bäumen sollten deshalb generell erfolgen, da es bei Massenproduktionen immer zu einzelnen Infektionen kommen kann, die nicht gleich entdeckt und eliminiert werden können.

6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die erzielten Ergebnisse zur Bodenübertragung der untersuchten Apfelviren erlauben erstmals eine auf Versuchen basierende Abschätzung des Ausbreitungsrisikos bei der Standardunterlage ‚Bittenfelder Sämling‘ in Reiserschnittgärten. Die für alle Viren auf Basis der Wiederholungszahl ermittelte Ereignisrate von $< 10\%$ lässt allerdings keine genauere Ermittlung zu, eine mögliche Übertragungsrate innerhalb der ersten drei Jahre nach Pflanzung liegt aber vermutlich deutlich darunter. Da Reiserschnittbäume in der Praxis im Regelfall jedoch bislang eine im Durchschnitt dreimal so lange Standzeit haben, wären längerfristige Beobachtungen notwendig, um eine Ereignisrate für die gesamte Standzeit zu ermitteln. Im Einzelfall könnten lokale Faktoren bei den Wachstumsbedingungen wie Bodenart, Nährstoffversorgung, Temperaturen usw. die Übertragungsrate beeinflussen, was aber hier nicht untersucht wurde. Im Vergleich zum Ausbreitungspotenzial virusinfizierten Materials über die vegetative Vermehrung lassen die hier vorliegenden Ergebnisse für eine Bodenübertragung jedoch keine größere Bedeutung erkennen, die in Reiserschnittgärten zu besonderen Maßnahmen Anlass geben würden. Fehlstellen durch die Rodung viruskranker Bäume können ohne ein erkennbares Risiko für Neuinfektionen über den Boden unmittelbar wiederbepflanzt werden. Die weitaus größte Gefahr für Virusinfektionen in Beständen geht deshalb immer noch von der Einschleppung bereits virusinfizierten Materials aus. In diesen Fällen könnten sich die ggf. erforderlichen Nachtestungen deshalb auf eng abgrenzbare Bereiche konzentrieren, in denen (soweit nachvollziehbar) virusinfizierte Sorten oder Unterlagen gepflanzt wurden.

Bei den vegetativ vermehrten Unterlagentypen deuten die vorliegenden Ergebnisse zur Virusverteilung in einem mehrere Jahre alten Baumschulquartier zwar auf eine Virusübertragung im Bodenbereich hin, erlaubten aber keine genauere Bestimmung einer Übertragungsrate, da der Ausgangsbefall nicht bekannt war. Zudem bewegten sich die Befallsraten auf einem insgesamt niedrigen Niveau. Da Unterlagenmutterbeete i.d.R. deutliche längere Standzeiten als Reiserschnittbäume aufweisen, könnte ein unentdeckter Ausgangsbefall im Laufe der Jahre möglicherweise jedoch zu größeren Befallsnestern führen.

Die Ergebnisse zur Nachweismöglichkeit der Apfelviren im Jahresverlauf lassen sich unmittelbar für die Laboruntersuchungen umsetzen. Testungen, die bislang zumeist in den Sommermonaten vorgenommen wurden, können durch eine Verlagerung in die Monate Januar bis April die Labore bei den Pflanzenschutzdiensten von Arbeitsspitzen

zu anderen Zeitpunkten, vor allem während der Vegetationszeit, entlasten. Die ermittelten Verdünnungsgrenzen lassen für jedes einzelne der untersuchten Viren für nahezu jeden Zeitpunkt im Jahresverlauf die Möglichkeit bzw. den Spielraum auch für Mischproben erkennen. Allerdings wurden die Daten für jedes Virus nur an jeweils einer Apfelsorte ermittelt, so dass für die Testung eines Bestandes mit einem Sortenspektrum, wie es in Reiserschnittgärten bzw. Unterlagenbaumschulen vorgefunden wird, ggf. Voruntersuchungen an weiteren Sorten v.a. bei geplanten Mischproben anzuraten sind.

Die ermittelte Kombination eines bestimmten Extraktions- und Nachweisverfahrens mit erhöhten Probenahmemengen für eine verbesserte Detektionsrate des Birnenverfalls im Jahresverlauf lassen sich weitgehend unmittelbar in die Praxis umsetzen. Die Anwendung erhöht im Vergleich zu den bisher meist eingesetzten Untersuchungsverfahren die Wahrscheinlichkeit, infiziertes Material umfassender bzw. früher zu entdecken und entsprechend eliminieren zu können.

Die stichprobenartigen Testungen auf Viren- bzw. Phytoplasmenfreiheit an Pflanzmaterial für einen Reiserschnittgarten blieben erfreulicherweise ohne Befund, beruhten aber nur auf wenigen Herkunftstypen und sind deshalb nicht repräsentativ. Die Ergebnisse lassen derzeit keinen unmittelbaren Handlungsbedarf für eine verstärkte Kontrolle von Vermehrungsbeständen bei Unterlagen und Edelreisern bei den betreffenden Lieferanten erkennen. Unabhängig davon kann es im Einzelfall aber sinnvoll oder notwendig sein, zur Vermeidung der Einschleppung und Ausbreitung von Infektionen in Reiserschnittgärten und Unterlagenbaumschulen Nachtestungen an Pflanzmaterial vorzunehmen.

7. Ursprünglich geplante und erreichte Ziele, weiterführende Fragestellungen

Das Projekt gliedert sich, wie in Kap.1.3 beschrieben, thematisch in vier Bereiche mit folgenden Zielen:

1. Untersuchung der Bedeutung einer Bodenübertragung der Apfelviren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) zur Abschätzung des Risikopotenzials einer Ausbreitung in Vermehrungsbeständen (Reisermuttergärten und Unterlagenbaumschulen) durch Topf- und Freilanduntersuchungen sowohl mit künstlich infizierten Pflanzen als auch in natürlich infizierten Beständen. Die Ergebnisse sollten Hinweise auf die Häufigkeit von Bodenübertragungen geben um ggf. den Umfang notwendiger Nachtestungen bei festgestellten Infektionen im Bestand und daraus folgende Eradikationsmaßnahmen einschätzen zu können. In Zusammenhang damit war auch die Frage von Interesse, ob nach Rodung viruskranker Pflanzen die Fehlstellen ohne Infektionsrisiko mit virusfreien Pflanzen unmittelbar nachbepflanzt werden können.
2. Ermittlung der Verdünnungsgrenzen beim PCR-Nachweis für die genannten Apfelviren im jahreszeitlichen Verlauf zur Empfehlung optimaler Probenahmezeitpunkte, auch im Hinblick auf mögliche Mischproben bei Massentestungen.

3. Die Identifizierung von Eintragungsquellen latenter Apfelviren und Phytoplasmen durch Stichprobenuntersuchungen an Pflanzmaterial für Reiser Muttergärten.
4. Ermittlung einer optimierten Kombination von Extraktions- und Nachweisverfahren sowie Probenahmemengen für eine verbesserte Detektionsrate des Birnenverfalls im jahreszeitlichen Verlauf.

Die Untersuchungen zur Bodenübertragung der genannten Apfelviren lassen erstmals auf Versuchsdaten beruhend eine Abschätzung des Ausbreitungspotenzials zu, wenn auch mit einer nicht näher bestimmbareren Übertragungsrate im unteren Prozentbereich. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass für die Topf-, Aufplanz- und Nachpflanzversuche aus Gründen der verfügbaren Arbeits- und Platzkapazität nur sehr begrenzte Wiederholungszahlen möglich waren, andererseits auf teilweise unsichere Ergebnisse, die sich infolge von Virusnachweisen ergaben, die sich in der Folgezeit nicht mehr bestätigen ließen. Für die Untersuchungen zur Virusausbreitung in Unterlagenbeständen stand eine große südbadische Baumschule leider nicht mehr wie geplant zur Verfügung, da diese zwischen dem Projektantrag und Projektbeginn geschlossen wurde. Stattdessen konnten ersatzweise nur eingeschränkt und kurzzeitig Untersuchungen zur Virusausbreitung in einer anderen Baumschule an einem etwas älteren Unterlagenbestand durchgeführt werden, bei dem allerdings die Ausgangsbefallsrate nicht bekannt war und deshalb nur indirekte Rückschlüsse auf eine Virusausbreitung möglich waren. Insofern liegen für vegetativ vermehrte Unterlagen keine direkten Daten für Virusübertragungen im Boden vor, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnten. Auch die Untersuchungsmöglichkeiten zur Virusverteilung in einem Reiserschnittgarten waren durch unvorhersehbare notwendige Rodungsaktionen aufgrund von Phytoplasmenbefall eingeschränkt. Die verbliebenen Restbestände boten keine ausreichende Untersuchungsgrundlage mehr.

Die Untersuchungen zum „Virustestkalender“ konnten weitgehend wie geplant durchgeführt und mit den Ergebnissen das angestrebte Ziel erreicht werden. Nur für ein Virus (ApMV) musste statt natürlich infizierter Reiserschnittbäume eine künstlich infizierte Sorte verwendet werden, da eine mit diesem Virus natürlich infizierte Sorte im Reiserschnittgarten nicht vorgefunden wurde. Es gab jedoch keine Anhaltspunkte dafür, dass dieser Umstand zu abweichenden Untersuchungsergebnissen hätte führen können. Allerdings konnten die Untersuchungen für jedes Virus aus Kapazitätsgründen nur an je einer Apfelsorte durchgeführt werden, was eine Einschränkung für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Sorten bedeutet und an weiteren Sorten verifiziert werden sollte. Problematisch wären allerdings nur geringere als die hier gefundenen Viruskonzentrationen, die mit der Standardverdünnung von 1:10 bei der Extraktion nicht mehr erfasst werden würden. Jedoch lässt sich dieses Risiko dadurch begrenzen, dass Untersuchungen nur im empfohlenen Zeitraum Januar bis April durchgeführt werden, in welchem die Virustiter insgesamt mit am höchsten im Jahresverlauf waren.

Stichprobenartigen Testungen an Pflanzmaterial wurden für zwei baden-württembergische Betriebe (Reiserschnittgarten, Unterlagenbaumschule) geplant. Da die Unterlagenbaumschule ihren Betrieb zwischenzeitlich eingestellt hatte (s. auch im

Abschnitt Bodenübertragung), wurde ein Ersatzbetrieb gesucht und gefunden, beim dem das Angebot für die (kostenfreien) Untersuchungen jedoch leider ohne Resonanz blieb. Insofern konnten nur für den Reiserschnittgarten Testungen stattfinden. Die Testmöglichkeiten waren von den Aufpflanzplänen des Betriebes für Kernobst abhängig, die aber bei der Projektplanung noch nicht feststanden. Insofern waren die Testumfänge weder zeitlich noch mengenmäßig im Voraus konkret planbar. Vor allem durch den Entfall der Unterlagenbestände blieben die vorgesehenen Untersuchungen hinter den Erwartungen und Möglichkeiten zurück. Auch die Prüfung einer größeren Anzahl verschiedener Herkünfte war dadurch nicht möglich, weshalb die Ergebnisse beim Pflanzmaterial insgesamt nicht als repräsentativ für den Virus- bzw. Phytoplasmenstatus gelten können. Insofern wären für eine fundiertere Abschätzung der Situation beim Pflanzmaterial umfangreichere Untersuchungen notwendig.

Die Untersuchungen zum Birnenverfall gestalteten sich unvorhergesehen problematisch, da sich von den zunächst vorgesehenen Extraktions- und Nachweisverfahren jeweils eines nach Versuchsbeginn als wenig bzw. nicht geeignet erwies. Bei den Extraktionsverfahren ließ ein Fertigkit für die Gesamt-DNA schnell erhebliche Schwächen in der Nachweisrate erkennen, so dass eine Fortführung damit nicht sinnvoll erschien. Beim LAMP-Verfahren versagte die zuerst ausgewählte Methode durch eine instabile chemische Komponente, die den Anwendern nicht bekannt war. Das zunächst eingesetzte Rt-PCR-Verfahren erwies sich als ungeeignet, da die in den Versuchen vorliegenden Stämme des Birnenverfalls von den Primern nicht erfasst wurden, wie sich nach längerer Fehlersuche herausstellte. Sowohl die LAMP als auch Rt-PCR wurden dann durch andere Varianten ersetzt. Dies hatte für die Rt-PCR allerdings zur Folge, dass die Untersuchungen nur nachträglich und nur zum Teil an den eingefrorenen Extrakten nachgeholt werden konnten, was eine geringere Vergleichsdatenbasis ergab. Noch nicht zufriedenstellend sind die erzielbaren Nachweisraten für den Birnenverfall auch unter Verwendung der aufgezeigten bestmöglichen Kombination von Nachweisverfahren und Probenahmemengen. Deshalb ist hierzu ein weiterer Forschungsbedarf absehbar, um die Detektionsraten für diesen Quarantäneschaderreger noch weiter zu verbessern.

8. Zusammenfassung

In den Versuchen zur Bodenübertragung, zur jahreszeitlichen Nachweisbarkeit der Apfelviren ACLSV, ApMV, ASGV und ASPV, der Einschleppung dieser Viren und Phytoplasmen mit Pflanzmaterial in einen Reiserschnittgarten sowie zur Methodenoptimierung zum Nachweis des Birnenverfallerreger konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

In Topf- und Freilandversuchen mit künstlich virusinfizierten Pflanzen und virusfrei gepflanzten Nachbarpflanzen (6 bzw. 10 Wiederholungen) ergab sich nur im Topfversuch ohne Wurzelsperre in zwei Fällen eine wiederholt nachweisbare Übertragung eines Virus (ACLSV und ASPV) auf Nachbarpflanzen, die erstmals nach 26 Monaten Versuchsdauer festgestellt wurde. Einige weitere Nachweise an anderen

Pflanzen im Topf- bzw. Freilandversuch, auch für andere Viren, ließen sich in der Folgezeit nicht bestätigen. In einer Variante des Topfversuches konnten Kunststoffnetze als Wurzelsperre direkte Wurzelkontakte oberhalb von ca. 200-300 µm Wurzeldurchmesser zwischen virusfreien und künstlich virusinfizierten Pflanzen verhindern. Falls es in einem Fall mit ACLSV trotz dieser Barriere tatsächlich zu einer Wurzelübertragung gekommen sein sollte, konnte dies nur über den Feinstwurzelbereich erfolgt sein. Im Freiland-Aufpflanzversuch zur Bodenübertragung konnte nach dreijähriger Standzeit keine dauerhafte Virusinfektion festgestellt werden, so dass die Ereignisrate für alle Viren als <10 % betrachtet werden kann; mögliche Virusübertragungsraten sind wahrscheinlich aber noch geringer anzusetzen. Untersuchungen von Bodeneluat, die aus Gefäßen mit virusinfizierten Pflanzen gewonnen wurden, ergaben keinen Virusnachweis. Ebenso führte eine Zugabe dieser Bodeneluate bei virusfreien Pflanzen über den Boden zu keiner Infektion. Auch ein Nachpflanzversuch, bei dem virusfreie Apfelunterlagen in einem Boden aufgepflanzt wurden, in welchem unmittelbar zuvor über mehrere Jahre virusinfizierte Bäume standen, ließ im Versuchszeitraum (24 Monate) keine Virusübertragung erkennen. Untersuchungen zur Virusverteilung in einem sechsjährigen Bestand vegetativ vermehrter Unterlagen einer Baumschule ließen eine mögliche Virusausbreitung durch Bodenübertragung vermuten, wenn auch auf einem insgesamt geringen Befallsniveau.

In Untersuchungen zum jahreszeitlichen Verlauf der Nachweisgrenzen konnten für die Apfelviren an je einer Sorte insgesamt die höchsten Konzentrationen im Zeitraum Januar bis April ermittelt werden. Bei den maximal erreichten Verdünnungsstufen gab es deutliche Unterschiede; am höchsten waren die Werte für ApMV, dann folgten in abnehmender Reihenfolge ACLSV, ASPV und ASGV. Letzteres bildet aufgrund seiner geringen Konzentration den limitierenden Faktor bei Mischproben.

Die Versuche zur Optimierung des Nachweises des Birnenverfalls durch die Kombination verschiedener Extraktions- und Detektionsverfahren sowie Probenmengen ergaben insgesamt die höchsten Nachweisraten bei der Silicalgeextraktion in Kombination mit der Rt-PCR und der Verwendung von fünf Triebstücken als Mischprobe je Baum. Gegenüber der nested PCR mit drei Triebstücken konnte dadurch eine nahezu doppelt so hohe Nachweisrate (66,7 gegenüber 35,4 %) erzielt werden. Die Ergebnisse für die Rt-LAMP bewegten sich dazwischen, lagen aber näher an der nested als an der Rt-PCR. Im Mittel aller Nachweisverfahren konnte durch die Verwendung von fünf gegenüber drei Triebstücken eine Steigerung der Detektionsrate um 27 % erreicht werden. Allerdings hatten die verschiedenen Unterlagen-/Sortenkombinationen einen großen Einfluss auf die Detektionsraten. Weiterhin wurde ein Einfluss des Untersuchungsjahres erkennbar. Als Probenahmezeitraum sollten die Wintermonate gewählt werden.

Die stichprobenartige Untersuchung (ca. 20 %) an ca. 1000 Apfel-, Quitten- und Birnenbäumen verschiedener Herkunft, die in einem Reiserschnittgarten zur Aufpflanzung kamen, auf Phytoplasmen bzw. Viren erbrachte keinen Nachweis eines Befalls.

9. Literaturverzeichnis

Arlı-Sokmen M., Kutluk-Yilmaz N.D., Mennan H., Sevik, M.A., 2005. Natural weed hosts of Apple mosaic virus in hazelnut orchards in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 87, 239-242.

Artnjen, A.: Herstellung infektiöser in vitro Transkripte und Vollängen cDNA Klone von Apple stem pitting virus (ASPV) und Apple stem grooving virus (ASGV) und Untersuchungen zur jahreszeitlichen Nachweisbarkeit dieser Viren im Apfelbaum. Dissertation Universität Heidelberg 2013

Artnjen, A., Jelkmann, W., 2010: Investigation of virus different tissues throughout the year and sequence variability of Apple stem pitting virus. *Julius-Kühn-Archiv* 427, 118-121

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J., 1990: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.

Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A., 2004: Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1175–84

Ciccotti, A.M.; Bianchedi, P.; Bragagna, P.; Deromedi, M.; Filippi, M.; Forno, F.; Mattedi, L.: (2008). Natural and experimental transmission of *Candidatus phytoplasma mali* by root bridges. In: Çaglayan, K.; Ertunç, F. (conveners) XXth International symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops and XIth International symposium on small fruit virus diseases. *Acta Horticulturae* 781, 459-464

Dhingra K.L., 1972: Transmission of Apple mosaic by natural root grafting. *Indian Journal of Horticulture* 29, 348-350, zitiert in: Lešnik et al.,2008.

Doyle, J.J., Doyle, J. L., 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15

Errea, P., Aguelo, V., Hormaza, J.I., 2002: Seasonal variations in detection and transmission of pear decline phytoplasma. *Journal of Phytopathology* 150, 439-443

Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e.V. (Hrsg.), 2006: Zusätzliche Technische Vertragsbedingungen und Richtlinien für Baumpflege – ZTV Baumpflege, Bonn

Fritzsche R., Kegler, H., 1968: Nematodes as vectors of virus diseases in fruit crops. *Tagungsberichte Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Berlin* 97, 289-295

Fuchs, E., Grüntzig, M., Al Kai, B., 1988: Der serologische Nachweis mechanisch übertragbarer Viren des Kern- und Steinobstes. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR* 42 (10), 208-211

Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A., Batlle, A., 2003: Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52, 513-520.

Gaudin, J., Semetey, O. Foissac, X., Eveillard, S., 2011: Phytoplasma titer in diseased lavender is not correlated, to lavender tolerance to stolbur phytoplasma. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), 179-180.

Grüntzig, M., Fuchs, E., Pfeilstetter, E., Al Kai, B., Otto, F., 1994: Untersuchungen zur Verteilung mechanisch übertragbarer Viren in Bäumen des Kern- und Steinobstes. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 29, 217-248

Guengerich, H.W., Millikan, D.F., 1965: Root grafting, a potential source of error in apple indexing. *Plant disease reporter* 49 (1), 39-41

Henkel, G., 2012: Bei Wurzelverwachsungen ist das Risiko gering. *Deutsche Baumschule*, Heft 2, 36-38

Hilber-Bodmer, Maja, Hasler, T., Buchmann, B., Bosshard, E., Frey, J.E., 2003: Apfelviren: molekularbiologischer Nachweis im Vergleich mit der konventionellen Indikatorartestung. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, Heft 15, 16-19

Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnkar, M., 2007: Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56, 785–796

Hunter, J.A., Chamberlain, E.E., Atkinson, J.D., 1958: Note on the transmission of Apple mosaic by natural root grafting. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1, 80-82.

Jaraus, W., Bisognin, C., Schneider, B., Grando, S., Velasco, R., Seemüller, E., 2011: Breeding apple proliferation-resistant rootstocks: durability of resistance and pomological evaluation. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), 275-276

Jelkmann, W., Paunovic, S., 2011: Apple stem pitting virus, S. 35-40, in: *Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits*. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Hrsg.), APS Press, St. Paul, Minnesota

Johnston, H., Bünter, M., Schärer, S., Genini, M., 2014: Diagnostik von Phytoplasmosen im Obstbau. *Obstbau* 39, 500-503

Kegler, G., Kleinhempel, H., Kegler, H., 1980: Untersuchung zur Bodenbürtigkeit des tomato bushy stunt virus. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 16, 73-76

Kegler, H., Kontzog, H-G., Kleinhempel, H., 1991: Das Verhalten pflanzenpathogener Viren im Boden (Übersichtsarbeit). Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 27 (5), 339-346

Knapp, E., da Câmara Machado, A., Pühringer, H., Wang, Q., Hanzer, V., Weiss, H., Weiss, B., Katinger, H., Laimer da Câmara Machado, M., 1995: Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of Malus sp. and Prunus sp.. Journal of Virological Methods 55(2),157-73.

Kramberger, P., Petrovič, N., Štrancar, A., Ravnikar, M., 2004: Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. Journal of Virological Methods 120, 51-57

Krczal, G., Albouy, J., Damy, I., Kusiak, C., Deogratias, J.M., Moreau, J.P., Berkelmann, B., Wohanka, W., 1995: Transmission of Pelargonium flower break virus (PFBV) in irrigation systems and by Thrips. Plant Disease 79, 163-166

Kundu, J.K., Svoboda, J., Polák, J., 2003: Detection of Apple Stem Grooving Virus in different tissues of apple trees throughout the year. Plant Protect. Sci. 39, 93-96

Kučerová, J., Karešová, R., Navrátil, M., Válová, P., 2007: Seasonal occurrence of ' Candidatus Phytoplasma pyri' in pear trees in the Czech Republic. Bulletin of Insectology 60, 263-264

Lešnik, M., Brzin, J., Mehle, N., Ravnikar, M., 2008: Transmission of ,*Candidatus phytoplasma mali*' by natural formation of root bridges in M9 apple rootstock. Agricultura 5, 43-46

Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995: Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. Phytopathology 85, 771-776

Nikolic P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M, 2010.- A panel of realtime PCR assaya for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group.- *Molecular and Cellular Probes*, 24: 303-309.

Maiss, E., Menzel, W., 2002: Entwicklung, Optimierung und Erprobung von Nachweisverfahren von Viren an Apfel: Schlussbericht des Forschungsauftrages 98 HS043. BMVEL

Massart, S., Jijakli, M.H., Kummert, J., 2011: Apple stem grooving virus, S. 29-33, in: Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Hrsg.), APS Press, St. Paul, Minnesota

Kundu, J.K., Svoboda, J., Polák, J., 2003: Detection of Apple Stem Grooving Virus in different tissues of apple trees throughout the year. Plant Protection Science 39, 93 - 96

Mehle, N., Ravnikar, M., 2012: Plant viruses in aqueous environment – Survival, water mediated transmission and detection. Water Research 46, 4902-4917.

Menzel, W.; Jelkmann, W., Maiss, E., 2002: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99, 81-92

Nicolić, P., Mehle, N., Gruden, K., Ravnikar, M., Dermastia, M., 2010: A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. Molecular and Cellular Probes 24, 303-309.

Petrzik, K., Lenz, O., 2011: Apple mosaic virus in Pome Fruits, S. 25-28, in: Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Hrsg.), APS Press, St. Paul, Minnesota

Svoboda, J., Polák, J., 2010: Relative concentration of Apple mosaic virus coat protein in different parts of apple tree. Hort.Sci. (Prague) 37 (1), 22-26

Roberts, A.G., 2014: Plant viruses: Soil borne. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000761.pub3

Seemüller, E., Kunze, L., Schaper, U., 1984a: Colonisation behavior of MLO and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 91, 525-532

Seemüller, E., Schaper, U., Kunze, L., 1986: Effect of pear decline on pear trees on 'Quince A' and *Pyrus communis* seedling rootstocks. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 93, 44-50.

Seemüller, E., Schaper, U., Zimbelmann, F., 1984b: Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 91, 371-382

Smith, P.R., Campbell, R.N., Fry, P.R., 1969: Root discharge and soil survival of viruses. Phytopathology 59, 1678-1687.

Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., Martín, M.P., 2005: Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19, 334–340

Yaegashi, H., Yoshikawa, N., Candresse, T., 2011: Apple chlorotic leaf spot virus in pome fruits, S. 17-21, in: *Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits*. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann (Hrsg.), APS Press, St. Paul, Minnesota

10. Realisierte und geplante Veröffentlichungen

Vorträge zu Teilergebnissen:

1. Im Arbeitskreis „Arbeitsgemeinschaft Muttergärten und Obstpflanzen-zertifizierung (AGMOZ) am 20.4.2015 in Dossenheim („Bodenübertragbarkeit latenter Apfelviren“)
2. Im Arbeitskreis Virologie der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft am 7.3.2016 in Hannover („Bodenübertragbarkeit und jahreszeitlicher Verlauf der Nachweisgrenzen einiger Apfelviren“)

Geplante Veröffentlichungen (Arbeitstitel):

1. Bodenübertragbarkeit von Apfelviren
2. Nachweismöglichkeit von Apfelviren im Jahresverlauf
3. Vergleich von Verfahren zum Nachweis des Birnenverfalls

Alle im „Journal of plant diseases and protection“ oder vergleichbarer Zeitschrift